



(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
18.11.2009 Bulletin 2009/47

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **09290311.1**

(22) Date de dépôt: **29.04.2009**

(84) Etats contractants désignés:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR

(30) Priorité: **13.05.2008 FR 0802575**

(71) Demandeur: **Commissariat à l'Energie Atomique Bâtiment D "Le Ponant"**
25 rue Leblanc
75015 Paris (FR)

(72) Inventeurs:
• **Le Vot, Sophie**
38800 Le Pont de Claix (FR)
• **Berthier, Jean**
38240 Meylan (FR)
• **Rivera, Florence**
38240 Meylan (FR)

(74) Mandataire: **Bolinches, Michel Jean-Marie et al**
Cabinet Orès
36, rue de St Pétersbourg
75008 Paris (FR)

(54) **Système microfluidique et procédé pour le tri d'amas de cellules et pour leur encapsulation en continu suite à leur tri**

(57) L'invention concerne un système microfluidique et un procédé pour le tri d'amas de cellules, tels que des îlots de Langerhans, et pour l'encapsulation en continu et de manière automatisée des amas une fois triés dans des capsules de tailles adaptées à celles de ces amas triés.

Un système microfluidique (101) selon l'invention comporte un substrat dans lequel est gravé un réseau de microcanaux comprenant une unité de tri (110) de cellules et autour duquel est scellé un capot de protection, et l'unité de tri comporte des moyens de déviation aptes à séparer lors de leur écoulement des amas (A) de cellules peu cohésifs de taille variant de 20 μm à 500 μm et de 20 à 10 000 cellules chacun environ, tels que des îlots de Langerhans, au moins deux microcanaux de tri (111 à 114) agencés en parallèle en sortie de ladite unité étant respectivement conçus pour véhiculer autant de catégories d'amas triés (A_t) en continu vers une unité d'encapsulation (120) de ces derniers également formée dans ledit réseau.

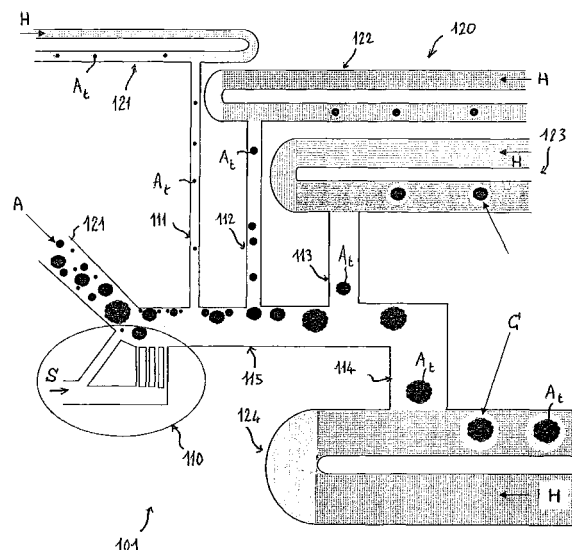


Fig. 8

Description

[0001] La présente invention concerne un système microfluidique et un procédé pour le tri d'amas de cellules, tels que des îlots de Langerhans, et pour l'encapsulation en continu et de manière automatisée des amas une fois triés dans des capsules de tailles adaptées à celles de ces amas triés. L'invention s'applique en particulier au couplage entre tri et encapsulation de tels amas de cellules, mais également d'une manière plus générale de cellules, de bactéries, d'organelles ou de liposomes, notamment.

[0002] L'encapsulation cellulaire est une technique qui consiste à immobiliser des cellules ou des amas de cellules dans des microcapsules, de façon à les protéger des attaques du système immunitaire lors d'une transplantation. La porosité des capsules doit permettre l'entrée des molécules de faible poids moléculaire essentielles au métabolisme des cellules encapsulées, telles que des molécules de nutriments, d'oxygène, etc., tout en empêchant l'entrée de substances de poids moléculaire plus élevé comme les anticorps ou les cellules du système immunitaire. Cette perméabilité sélective des capsules est ainsi conçue pour assurer l'absence de contact direct entre les cellules encapsulées du donneur et celles du système immunitaire du receveur de la transplantation, ce qui permet de limiter les doses de traitement immunosuppresseur utilisées lors de la transplantation (ce traitement présentant des effets secondaires lourds).

[0003] Parmi les multiples applications de l'encapsulation, on peut citer celle des îlots de Langerhans, amas de cellules fragiles situés dans le pancréas et constitués de plusieurs types cellulaires dont les cellules β qui régulent la glycémie dans le corps par production de l'insuline. L'encapsulation de ces îlots est une alternative aux thérapies cellulaires classiques (e.g. transplantation de pancréas ou d'îlots) utilisées pour soigner le diabète insulino-dépendant, maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire détruit ses propres cellules β productrices d'insuline.

[0004] Les capsules produites doivent répondre à certains critères, dont la biocompatibilité, la résistance mécanique et la perméabilité sélective, en particulier. Un autre critère essentiel est la taille des capsules, car en l'ajustant au mieux à la taille des amas de cellules (voir référence [1]):

- on diminue la quantité de polymère « inutile » autour des cellules et donc le temps de réponse de ces dernières. Par exemple, la régulation de la glycémie par des îlots de Langerhans encapsulés dans des capsules de taille adaptée sera plus rapide, car le glucose diffusera plus rapidement vers l'îlot et l'insuline produite s'en échappera plus rapidement ;
- on maximise la viabilité des îlots encapsulés du fait que la diffusion de l'oxygène y est plus rapide, ce qui améliore l'oxygénation des cellules et réduit les risques d'apparition de zones nécrosées ; et

- on diminue le volume de capsules à transplanter, ce qui peut permettre l'implantation des capsules dans des zones plus propices à la revascularisation des tissus. En effet, cette revascularisation est essentielle pour éviter les nécroses des cellules encapsulées, car les cellules doivent être situées à proximité du réseau sanguin pour être bien approvisionnées en nutriments et en oxygène, notamment. Par exemple, pour le traitement du diabète insulino-dépendant, ce volume réduit permet d'implanter les îlots encapsulés dans le foie ou la rate, régions plus favorables à la revascularisation que la cavité péritonéale où les capsules sont classiquement implantées pour des questions d'encombrement stérique.

[0005] Si les propriétés de biocompatibilité, de résistance mécanique ou de perméabilité sélective semblent bien acquises d'après la littérature, il n'en est pas de même pour la taille des capsules qui est particulièrement problématique pour l'encapsulation des îlots de Langerhans. En effet, dans tous les documents connus de la Demanderesse à ce jour, la taille des capsules formées autour de ces îlots est fixe et en moyenne de l'ordre de 600 à 800 μm , alors que ces îlots ont une taille variant de 20 à 400 μm seulement. Une taille de capsules fixe et identique quelle que soit la taille de l'îlot pose donc problème, d'autant plus que des études récentes ont montré que les îlots les plus performants sont les plus petits (voir référence [2]).

[0006] Les principales méthodes d'encapsulation connues utilisent au choix :

- un jet d'air ou de liquide coaxial, les capsules produites ayant une taille variant entre 400 μm et 800 μm (cependant la taille moyenne des capsules produites est plus proche de 600-800 μm que de 400 μm) ;
- une différence de potentiel, qui est la technique d'encapsulation la plus utilisée lorsque la priorité est de diminuer la taille des capsules (la taille des capsules varie dans ce cas entre 200 et 800 μm) ; ou
- une technique de vibration, qui présente l'inconvénient d'être parfois limitée par les viscosités des solutions utilisées.

[0007] Les principaux inconvénients de ces techniques sont :

- les tailles des capsules qui ne sont pas forcément adaptées à celles des îlots de Langerhans à encapsuler ;
- l'absence d'automatisation de la procédure d'encapsulation, où les capsules sont gélifiées en tombant dans un bain de polycations et sont ensuite récupérées manuellement, ce qui génère une hétérogénéité du temps de polymérisation d'une capsule à une autre ;
- la dispersion en taille des capsules, qui augmente

lorsque la taille des gouttes diminue ; et

- un manque de reproductibilité des capsules produites, qui ne sont pas forcément sphériques.

[0008] On a développé récemment des systèmes microfluidiques adaptés au tri par taille de bactéries, de cellules, d'organelles, de virus, d'acides nucléiques ou même de protéines, parmi lesquels on peut citer :

- ceux réalisant un tri par « Deterministic Lateral Displacement » ou « DLD » (i.e. déplacement latéral déterministe, voir références [6-8] et par exemple les documents WO-A-2004/037374, US-A-2007/0059781 et US-A-2007/0026381), qui repose sur l'utilisation d'un réseau périodique d'obstacles qui vont perturber ou non la trajectoire des particules à trier. Les particules plus petites qu'une taille critique D_c , fixée par la géométrie du dispositif, ne sont globalement pas déviées par ces obstacles, tels que des plots, tandis que celles plus grandes que cette taille D_c sont déviées dans la même direction à chaque rangée de plots. La trajectoire des plus grosses particules est donc finalement déviée par rapport à celle des plus petites, ce qui permet la séparation en taille des particules, étant précisé que dans la technique « DLD » l'espacement entre deux plots adjacents est toujours supérieur à la taille des particules à dévier. Ce dispositif est adapté aux échantillons sanguins (séparation des globules rouges, blancs et du plasma) ;
- les systèmes réalisant un tri par filtration hydrodynamique (voir références [9, 10] et les documents JP-A-2007 021465, JP-A-2006 263693, et JP-A-2004 154747), qui consiste à adapter les résistances fluidiques de canaux transverses en choisissant un rapport de débits approprié entre le canal principal et ces canaux transverses. De ce fait, les particules dont la taille est supérieure à une taille critique (fixée par la valeur de la résistance fluidique) ne peuvent pénétrer dans ces canaux transverses, même si leur taille est inférieure à la largeur des canaux transverses ;
- des systèmes de tri par taille plus simples n'utilisant que la déviation des lignes d'écoulement (voir références [11, 12] et par exemple le document WO-A-2006/102258) où, dans la zone de tri, les lignes d'écoulement sont déviées vers une zone de basse pression: la différence de positionnement des lignes d'écoulement est accentuée, et comme les particules suivent les lignes d'écoulement sur lesquelles leur centre d'inertie est positionné, la différence de position entre petites et grosses particules est accentuée ;
- les systèmes de tri utilisant des filtres qui permettent soit de laisser passer des molécules de taille inférieure à une valeur critique (voir le document US-A-2005/0133480), soit de ne laisser passer que le fluide pour concentrer les particules ou séparer le fluide

qui les véhicule (voir dans ce cas le document WO-A-2006/079007). La principale limitation de ces systèmes de tri par filtres est le risque de colmatage des canaux par les particules ; et

- les systèmes de tri où la microfluidique est couplée à un champ extérieur, comme par exemple les mesures optiques de fluorescence ou d'absorbance (voir les documents WO-A-2002/023163 et WO-A-02/40874), les pièges optiques, la diélectrophorèse, les mesures de conductimétrie, de potentiométrie, d'ampérométrie, les détections de liaisons ligand/récepteur, etc.

[0009] Un inconvénient majeur de tous les systèmes microfluidiques de tri présentés dans ces documents est qu'ils ne sont pas du tout adaptés au tri d'amas de cellules, tels que des îlots de Langerhans ou d'autres amas peu cohésifs de tailles similaires. En effet et comme expliqué précédemment, chacun de ces amas se comporte bien différemment d'une cellule du fait de sa taille (de 20 μm à 400 μm pour des îlots de Langerhans contre une dizaine de μm pour une cellule unique) et également du fait de sa faible cohésion (qui impose des cisaillements faibles dans le système microfluidique de tri utilisé).

[0010] Le seul système connu de la Demanderesse pour réaliser le tri de tels amas de cellules, est le cytomètre en flux de dénomination « COPAS » qui est commercialisé par la société Union Biometrica. Ce système, qui n'est pas de type microfluidique, réalise le tri par taille des amas en mesurant leurs temps de vols respectifs dans le faisceau d'un rayonnement laser (voir référence [13]).

[0011] On a également développé dans un passé récent des systèmes microfluidiques d'encapsulation qui utilisent des émulsions pouvant être notamment formées :

- au niveau d'une jonction en T (voir référence [14]),
- au niveau de l'orifice d'un dispositif microfluidique focalisant l'écoulement « MFFD » (i.e. « Microfluidic Flow Focusing Device », voir référence [15]),
- au travers de microcanaux structurés (cf. référence [16]), ou
- au travers de buses (voir référence [17]).

[0012] Ces systèmes d'encapsulation font l'objet de nombreux documents, parmi lesquels les documents WO-A-2004/071638, US-A-2007/0054119, FR-A-2776535, JP-A-2003 071261 et US-A-2006/0121122 et, plus particulièrement pour l'encapsulation de cellules ou d'amas de cellules et la gélification des capsules formées, les documents US-A-2006/0051329, WO-A-2005/103106 et WO-A-2006/078841.

[0013] L'étape de gélification est effectuée directement sur le microsystème avec des microcanaux en serpentin ou en « H », comme décrit dans les documents US-A-2006/0051329 et WO-A-2005/103106.

[0014] Le principal inconvénient de ces systèmes mi-

crofluidiques d'encapsulation est le même que celui précité en introduction, qui est l'obtention d'une seule taille de capsules quelle que soit la taille des amas de cellules. A la connaissance de la Demanderesse, seul le dispositif de Wyman et al. (voir référence [18] et le document US-A-2007/0009668) permet d'adapter la taille de la capsule à la taille des amas de cellules, tels que des îlots de Langerhans, en les enveloppant dans des capsules d'épaisseur constante voisine de 20 μm , mais indépendamment de la taille des îlots encapsulés. Dans ce dernier document, une phase aqueuse est placée au dessus d'une phase d'huile et, par ajustement des densités respectives de ces deux phases, les îlots se retrouvent à l'interface eau/huile. Un tube de prélèvement placé dans l'huile à une certaine distance de l'interface permet d'aspirer la phase aqueuse et les îlots en un fin jet, lequel, sous l'effet de la tension de surface, se rompt en laissant à la surface des îlots une fine enveloppe d'hydrogel d'épaisseur fixe qui est polymérisée par irradiation aux UV. Ce dispositif est cependant un dispositif macroscopique, et pas un système microfluidique.

[0015] Un but de la présente invention est de proposer un système microfluidique remédiant à l'ensemble des inconvénients précités, qui comporte un substrat dans lequel est gravé un réseau de microcanaux, qui comprend une unité de tri de cellules et autour duquel est scellé un capot de protection.

[0016] A cet effet, un système microfluidique selon l'invention est tel que l'unité de tri comporte des moyens de déviation aptes à séparer lors de leur écoulement, de préférence selon leur taille, des amas de cellules peu cohésifs de taille variant de 20 μm à 500 μm et de 20 à 10 000 cellules chacun environ, tels que des îlots de Langerhans, au moins deux microcanaux de tri agencés en parallèle en sortie de ladite unité étant respectivement conçus pour véhiculer autant de catégories d'amas triés vers une unité d'encapsulation de ces derniers également formée dans ledit réseau.

[0017] Par « taille » des amas de cellules ou des capsules les enrobant, on entend dans la présente description le diamètre, dans le cas d'un amas ou d'une capsule sensiblement sphérique, ou plus généralement la plus grande dimension transversale de cet amas ou de cette capsule (e.g. le grand axe d'une section elliptique dans l'approximation d'un ellipsoïde de révolution).

[0018] On notera que les microcanaux dédiés au tri du microsystème selon l'invention sont aptes à séparer par déviation ces amas de cellules, tels que des îlots de Langerhans, de par leur échelle qui est bien différente de celle des systèmes microfluidiques connus seulement adaptés au tri de cellules uniques. En effet, la taille de ces îlots varie de manière connue de 20 à 400 μm contre 1 à 10 μm en moyenne pour une cellule, et les îlots doivent être manipulés avec encore plus de précaution que des cellules uniques à cause de leur fragilité et de leur faible cohésion, ce qui limite la gamme de cisaillements applicable par l'unité de tri.

[0019] Avantageusement, ladite unité de tri peut com-

prendre au moins un étage de tri par taille desdits amas qui est conçu pour générer dans lesdits microcanaux de tri respectivement au moins deux catégories de tailles pour lesdits amas triés.

[0020] On notera que le(s) étage(s) de tri par taille formé(s) par un groupe déterminé de microcanaux du système selon l'invention permet(tent) d'obtenir autant de catégories de tailles que souhaité (en fonction du nombre de microcanaux de tri prévus en parallèle), et en particulier d'adapter la taille des capsules formées suite à ce tri à la taille de chaque catégorie d'amas triés de cellules.

[0021] On notera également qu'il est possible de coupler plusieurs étages successifs de tri par taille (i.e. des étages agencés les uns à la suite des autres) pour optimiser la performance finale de l'unité de tri.

[0022] Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits moyens de déviation dudit ou de chaque étage de tri sont hydrodynamiques à fluidique passive, étant de préférence de type à focalisation hydrodynamique, de type à déplacement latéral déterministe (« DLD ») au moyen d'un arrangement de plots de déviation que comporte au moins un microcanal de cet étage, ou bien de type à filtration hydrodynamique au moyen de microcanaux de filtration agencés transversalement à un microcanal principal.

[0023] En variante, ces moyens de déviation selon l'invention du ou de chaque étage de tri peuvent être de type hydrodynamiques couplés à des forces électrostatiques, magnétiques ou à des ondes électromagnétiques ou acoustiques.

[0024] Selon une autre caractéristique de l'invention, une unité d'encapsulation, apte à encapsuler de manière automatisée lesdits amas triés en fonction de leur catégorie, est en outre formée dans ledit réseau en communication fluide avec lesdits microcanaux de tri, cette unité d'encapsulation étant apte à former en continu autour de chaque amas trié une capsule monocouche ou multicouches biocompatible, mécaniquement résistante et à perméabilité sélective.

[0025] Cette unité d'encapsulation peut comprendre une pluralité de sous-unités d'encapsulation qui sont respectivement agencées en parallèle en communication avec lesdits microcanaux de tri pour former, pour chaque catégorie de taille d'amas triés y circulant, une capsule de taille prédéterminée conçue pour envelopper au plus près chaque amas de cette catégorie.

[0026] Avantageusement, chaque sous-unité d'encapsulation peut comporter un dispositif de formation desdites capsules choisi dans le groupe constitué par les dispositifs à jonction en « T », les dispositifs microfluidiques de focalisation d'écoulement « MFDD », les dispositifs à réseau de microcanaux structurés « MC array » et les dispositifs à réseau de microbusés « MN array ».

[0027] En variante, chaque sous-unité d'encapsulation peut comporter un échangeur de matière entre une phase aqueuse comprenant lesdits amas triés au sein de chaque catégorie et une phase non miscible avec

cette phase aqueuse, par exemple huileuse, cet échangeur étant conçu pour former les capsules par rupture de l'interface entre ces deux phases due à une surpression.

[0028] Selon une autre caractéristique de l'invention, ladite unité d'encapsulation peut comprendre en outre des moyens de gélification des capsules formées, comprenant un échangeur de matière constitué de microcanaux et dédié au transfert de ces capsules d'une phase d'encapsulation les contenant, par exemple de type huile-alginate, vers une phase de gélification aqueuse ou non.

[0029] On notera que le microsystème selon l'invention permet ainsi d'automatiser entièrement la procédure d'encapsulation des amas de cellules, en ce sens que l'opérateur n'a plus qu'à remplir les différents réservoirs correspondant aux matériaux nécessaires à l'encapsulation et récupérer en sortie les capsules adaptées à la taille des amas préalablement triés.

[0030] Le microsystème réalise donc de manière continue et automatisée les étapes de tri, de formation des capsules et de gélification, et il peut être adapté aussi bien à une simple encapsulation qu'à une encapsulation multicouches. Dans ce dernier cas, le module d'encapsulation est complexifié par intégration d'étapes de rinçage des capsules et de mise en contact avec d'autres solutions de polymères ou de polycations.

[0031] De préférence, est en outre formé dans ledit réseau de microcanaux un module microfluidique de transfert conçu pour transférer lesdits amas triés d'un milieu de culture les contenant vers une phase d'encapsulation destinée à les contenir dans ladite unité d'encapsulation, ce module de transfert étant en communication fluidique avec chacun desdits microcanaux de tri et étant conçu pour minimiser les pertes de charge dans ladite unité de tri.

[0032] En effet, les îlots destinés à la transplantation sont conservés dans un milieu de culture, mais pour l'encapsulation, ils doivent être transférés dans une solution de polymère (fluide le plus souvent non newtonien, de viscosité élevée même à faible cisaillement). Pour automatiser au maximum la procédure d'encapsulation, ledit module de transfert est intégré au microsystème, entre l'unité de tri et celle d'encapsulation de façon à limiter les pertes de charges dans cette unité de tri, compte tenu du fait que la résistance fluidique est proportionnelle à la viscosité de la solution déplacée.

[0033] Ce module de transfert présente en outre l'avantage de diminuer la pression totale dans le microsystème, et donc de limiter les risques de fuites lorsque les pressions appliquées sont trop élevées.

[0034] Selon une autre caractéristique importante de l'invention, ledit système microfluidique comprend en outre avantageusement un module de couplage de ladite unité de tri à ladite unité d'encapsulation, qui est conçu pour maintenir un régime fluide laminaire dans ces deux unités en faisant communiquer directement ou bien sélectivement l'unité d'encapsulation avec l'unité de tri.

[0035] On notera qu'aucun microsystème connu n'a ainsi couplé l'étape de tri à celle d'encapsulation. Or, ce couplage n'est pas aisé à mettre en oeuvre, car la fluidique de l'unité de tri peut venir perturber celle de l'unité d'encapsulation. Il est donc nécessaire de modéliser les pertes de charges (i.e. les résistances fluidiques) globales des microcanaux concernés, pour conserver un régime fluide laminaire dans ces deux unités. Cette modélisation est d'autant plus compliquée que l'encapsulation utilise le plus souvent des polymères non newtoniens (e.g. l'alginate) dont la viscosité dépend du cisaillement appliqué au fluide, ce qui complexifie la modélisation du système global.

[0036] Selon un exemple de réalisation de l'invention, ce module de couplage est constitué de microcanaux intermédiaires qui relient respectivement lesdits microcanaux de tri à ladite unité d'encapsulation et qui présentent des dimensions et une géométrie adaptées pour le maintien dudit régime laminaire en amont et en aval.

[0037] L'inconvénient de ce module de couplage selon cet exemple de réalisation est que, outre la conception dimensionnelle précise qui est requise pour ces microcanaux intermédiaires, il peut y avoir formation d'un grand nombre de capsules vides dans chaque sous-unité d'encapsulation, ce qui peut nécessiter en sortie de cette dernière un tri final entre capsules vides et capsules contenant des amas triés.

[0038] Selon un autre exemple préférentiel de réalisation de l'invention, ce module de couplage comprend des microréservoirs tampon de stockage des amas triés, dans chacun desquels débouche l'un desdits microcanaux de tri et qui sont chacun reliés sélectivement à l'unité d'encapsulation par un microcanal de sortie qui est destiné à véhiculer les amas triés et concentrés et qui est équipé d'une vanne fluide par exemple de type à bulle d'air ou à gel bloquant pouvant être dissous (de préférence à gel d'alginate, dans le cas de l'utilisation d'alginate pour l'encapsulation), de sorte que l'ouverture et la fermeture de la vanne abaisse et élève respectivement la concentration des amas triés dans chaque microréservoir en fonction du nombre de capsules en cours de formation dans l'unité d'encapsulation.

[0039] On notera que ce module de couplage préférentiel à vanne fluide permet de minimiser la formation de capsules vides par ce réglage de la concentration dans chaque microréservoir.

[0040] Avantageusement, chaque microréservoir tampon peut être en outre pourvu d'une pluralité de fins microcanaux transverses de sortie qui sont conçus pour permettre l'évacuation de la phase contenant lesdits amas à l'exception de ces derniers, lorsque ladite vanne est fermée.

[0041] D'une manière générale, on notera que les systèmes microfluidiques selon l'invention doivent être stérilisables, car les capsules formées par l'unité d'encapsulation doivent pouvoir être transplantées chez un individu.

[0042] Un procédé selon l'invention pour le tri d'amas

peu cohésifs de cellules de taille variant de 20 μm à 500 μm et de 20 à 10 000 cellules environ, tels que des îlots de Langerhans, consiste à faire circuler ces amas dans un réseau de microcanaux d'un système microfluidique de géométrie adaptée à la taille et au nombre de ces amas à séparer, et à les dévier les uns des autres selon l'un de leurs paramètres, tel que leur taille, de manière à les diriger vers au moins deux microcanaux de tri véhiculant en parallèle autant de catégories d'amas triés, en vue de leur encapsulation dans ce même système.

[0043] Avantageusement, l'on utilise au moins un étage de tri par taille desdits amas pour générer dans lesdits microcanaux de tri respectivement au moins deux catégories de tailles pour lesdits amas triés, chaque étage utilisant :

- une déviation hydrodynamique à fluide passive, de préférence par focalisation hydrodynamique, par déplacement latéral déterministe (« DLD ») ou par filtration hydrodynamique, ou
- une déviation hydrodynamique couplée à des forces électrostatiques, magnétiques ou à des ondes électromagnétiques ou acoustiques.

[0044] Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on peut encapsuler en outre de manière automatisée ces amas triés en parallèle en fonction de leur catégorie, en formant en continu autour de chaque amas trié une capsule monocouche ou multicouches biocompatible, mécaniquement résistante et à perméabilité sélective.

[0045] Avantageusement, l'on forme alors, pour chaque catégorie de taille d'amas triés, une capsule de taille prédéterminée enveloppant au plus près chaque amas de cette catégorie, de préférence avec une taille de capsule d'environ $D_a + 20 \mu\text{m}$ à $D_a + 150 \mu\text{m}$, préférentiellement $D_a + 50 \mu\text{m}$, pour une catégorie d'amas triés selon une taille critique inférieure à une valeur D_a .

[0046] De préférence, on forme ces capsules pour chaque catégorie d'amas trié par un dispositif choisi dans le groupe constitué par les dispositifs à jonction en « T », les dispositifs microfluidiques de focalisation d'écoulement « MFDD », les dispositifs à réseau de microcanaux structurés « MC array » et les dispositifs à réseau de microbuses « MN array ».

[0047] En variante, on peut former ces capsules par échange de matière entre une phase aqueuse comprenant les amas triés au sein de chaque catégorie et une phase non miscible avec cette phase aqueuse, par exemple huileuse, la rupture de l'interface entre ces deux phases par une surpression générant ces capsules.

[0048] Selon une autre caractéristique de l'invention, l'on gélifie ensuite les capsules formées, par un transfert de ces capsules et de la phase d'encapsulation les contenant, par exemple de type huile-alginate, vers une phase de gélification aqueuse ou non.

[0049] Le polymère utilisé pour l'encapsulation peut être par exemple un hydrogel d'alginate, polymère le plus couramment utilisé pour l'encapsulation. Toutefois, l'en-

capsulation selon l'invention ne se limite pas à cet hydrogel et d'autres matières d'encapsulation pourraient être choisies, comme le chitosan, les carraghénanes, les gels d'agarose, les polyéthylènes glycols (PEG), à titre non limitatif, à condition d'adapter l'unité d'encapsulation au type de gélification que requiert le polymère choisi.

[0050] De préférence, avant chaque encapsulation, l'on transfère les amas triés d'un milieu de culture les contenant vers la phase d'encapsulation destinée à les contenir, pour minimiser les pertes de charge lors du tri.

[0051] Egaleme nt à titre préférentiel, le procédé selon l'invention comprend en outre un couplage fluide entre le tri et l'encapsulation ayant pour effet de maintenir un régime fluide laminaire dans les microcanaux correspondants, ce couplage faisant communiquer directement ou bien sélectivement lesdits amas triés avec la phase d'encapsulation.

[0052] Comme indiqué précédemment, on peut réaliser ce couplage au moyen de microcanaux intermédiaires de dimensions et de géométrie adaptées pour le maintien du régime laminaire lors du tri et de l'encapsulation.

[0053] En variante, on réalise préférentiellement ce couplage en réglant la concentration de chaque catégorie d'amas triés dans un microréservoir tampon de stockage des amas communiquant avec l'un desdits microcanaux de tri et relié sélectivement par ladite vanne fluide à un microcanal de sortie véhiculant les amas triés et concentrés, l'ouverture et la fermeture de cette vanne abaissant et élevant respectivement la concentration des amas triés dans le microréservoir en fonction du nombre de capsules en cours de formation, pour minimiser la formation de capsules vides. Ce microréservoir est en outre avantageusement pourvu d'une pluralité de fins microcanaux transverses de sortie conçus pour évacuer la seule phase contenant ces amas sans ces derniers, lorsque la vanne est fermée.

[0054] Avantageusement, lesdits amas de cellules triés dans le procédé de l'invention sont des îlots de Langerhans qui sont encapsulés avec une taille de capsules variant de 70 μm à 200 μm pour les îlots triés selon une taille inférieure à 50 μm , avec une taille de capsules pouvant atteindre 650 μm pour les plus gros îlots triés selon une taille de 500 μm par exemple.

[0055] Une utilisation selon l'invention d'un système microfluidique tel que présenté ci-dessus consiste à trier soit des cellules, bactéries, organelles, liposomes, soit des amas de cellules, de préférence selon des catégories d'intérêt via des molécules d'adhésion dans le premier cas, ou bien selon des catégories de tailles dans le cas d'amas de cellules, puis à les encapsuler en continu et de manière automatisée pour chaque catégorie triée.

[0056] On notera en effet que l'invention n'est pas limitée au seul tri par taille puis à l'encapsulation d'amas de cellules, mais qu'elle vise d'une manière générale tout couplage d'une encapsulation à un tri préalable de cellules, de bactéries, d'organelles ou de liposomes au sein d'une population hétéroclite de ces particules très diffé-

rentes, de façon à n'encapsuler que les cellules/bactéries/organelles/liposomes d'intérêt.

[0057] D'autres avantages, caractéristiques et détails de l'invention ressortiront du complément de description qui va suivre en référence à des dessins annexés, donnés uniquement à titre d'exemples et dans lesquels :

la figure 1 est une vue schématique en coupe transversale d'un système microfluidique selon l'invention dans une première phase de son procédé de fabrication montrant l'oxydation du substrat,

la figure 2 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 1 dans une seconde phase de son procédé de fabrication montrant l'étalement d'une résine photosensible sur ce substrat oxydé,

la figure 3 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 2 dans une troisième phase de son procédé de fabrication montrant le résultat d'étapes suivantes de photolithographie et de gravure sèche, permettant de créer les microcanaux,

la figure 4 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 3 dans une quatrième phase de son procédé de fabrication montrant le résultat d'étapes de gravure profonde,

la figure 5 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 4 dans une cinquième phase de son procédé de fabrication montrant le résultat d'une étape de délaquage de la résine et de désoxydation par gravure humide,

la figure 6 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 5 dans une sixième phase de son procédé de fabrication montrant le résultat d'une étape de d'oxydation,

la figure 7 est une vue schématique en coupe transversale du système de la figure 6 dans une septième phase de son procédé de fabrication montrant le résultat d'une étape de scellement d'un capot de protection afin de délimiter la section des microcanaux,

la figure 8 est une vue schématique partielle de dessus d'un système microfluidique selon un exemple de réalisation de l'invention, montrant une unité de tri par filtration hydrodynamique et une unité d'encapsulation par des jonctions en T qui lui est couplée,

la figure 9 est un cliché modélisant les lignes d'écoulement au sein d'un exemple d'unité de tri selon l'invention par focalisation hydrodynamique,

la figure 10 est une vue schématique de dessus d'un microcanal d'une unité de tri selon l'invention qui est équipé de moyens de déviation par déplacement latéral déterministe (« DLD »),

la figure 11 est une vue de détail du médaillon de la figure 10 montrant de manière symbolique un exemple de déviation de trajectoire obtenu par ces moyens de déviation,

la figure 12 est un cliché modélisant les lignes d'écoulement au sein d'un autre exemple d'unité de

tri selon l'invention par filtration hydrodynamique, la figure 13 est un cliché représentant schématiquement un agencement de microcanaux formant un module de transfert des îlots triés d'un milieu de culture vers une solution d'alginate utilisée pour l'encapsulation,

la figure 14 est un diagramme à blocs illustrant quatre étages de tri respectivement couplés à quatre sous-unités d'encapsulation dans un exemple de mise en oeuvre du procédé de tri/ encapsulation selon l'invention,

les figures 15 et 16 sont respectivement deux clichés représentant schématiquement une jonction en T et un dispositif focalisant de type « MFFD », chacun étant destiné à la formation d'une émulsion dans chaque sous-unité d'encapsulation selon l'invention,

la figure 17 est une vue schématique d'un module de gélification inclus dans l'unité d'encapsulation selon l'invention, pour transférer les capsules formées d'une phase huileuse vers une phase aqueuse,

la figure 17a est une vue schématique en coupe verticale d'un module de gélification selon une variante de la figure 17, qui peut être inclus dans l'unité d'encapsulation selon l'invention,

la figure 17b est une vue schématique en coupe verticale d'un module de gélification selon une variante de la figure 17a, qui peut être inclus dans l'unité d'encapsulation selon l'invention,

la figure 17c est une vue schématique partielle en coupe verticale d'une variante selon l'invention de l'élément séparateur prévu en sortie du module de gélification des figures 17a ou 17b,

les figures 18 et 19 sont respectivement deux vues schématiques de modules de couplage selon un premier et un second exemples de l'invention, qui sont chacun reliés à un étage de tri et à une sous-unité correspondante d'encapsulation,

la figure 20 est une vue schématique d'une unité d'encapsulation par fluidique passive selon un autre exemple de réalisation de l'invention, suite à un tri par taille effectué de préférence par déplacement latéral déterministe (« DLD »), et

la figure 21 est une vue schématique d'une unité d'encapsulation selon l'invention illustrant notamment les étapes de formation de capsules à trois couches par un dispositif focalisant, et leur gélification.

[0058] Un système microfluidique 1 selon l'invention peut par exemple être réalisé comme suit, en référence aux figures 1 à 7 qui rendent compte de diverses étapes se basant sur des procédés connus de microélectronique sur silicium, i.e. notamment la lithographie, la gravure profonde, l'oxydation, le « stripping » et le scellement d'un capot de protection 2 sur le substrat 3. Cette technologie sur silicium présente l'avantage d'être très précise (de l'ordre du micromètre) et non limitative tant dans les profondeurs de gravure qu'au niveau des largeurs

des motifs. Plus précisément, le protocole de réalisation du microsystème 1 est le suivant :

[0059] Un dépôt d'oxyde de silicium 4 (figure 1) est effectué sur le substrat de silicium. Puis une résine photosensible 5 est déposée par étalement en face avant (figure 2), suite à quoi l'oxyde de silicium 4 est gravé à travers la couche de résine 5 par photolithographie et gravure sèche de l'oxyde de silicium 4 en s'arrêtant sur le substrat 3 de silicium (figure 3).

[0060] Ce substrat 3 est ensuite gravé à la profondeur souhaitée des microcanaux par une gravure profonde 6 (figure 4), puis la résine est « délaquée » (figure 5). L'oxyde de silicium 4 thermique restant est ensuite éliminé par désoxydation au moyen d'une gravure humide (figure 5), puis une nouvelle couche d'oxyde thermique 7 est déposée (figure 6).

[0061] Les puces obtenues sont ensuite découpées et un capot de protection 2 en verre - ou en un autre matériau transparent pour permettre l'observation - est scellé, par exemple par scellement anodique ou scellement direct (figure 7).

[0062] Avant montage des microcanaux ou capillaires (non illustrés), un traitement de surface du type silanisation hydrophobe peut aussi être effectué.

[0063] Le protocole décrit ci-dessus est l'un des multiples protocoles de fabrication pouvant être suivis. Par ailleurs, on pourrait utiliser pour le substrat 3 un matériau autre que le silicium, par exemple un PDMS (polydiméthylsiloxane) ou bien un autre élastomère, par moulage sur un « master » (i.e. matrice) préalablement préparé par photolithographie par exemple. On notera que cette technique de fabrication est bien adaptée au cas où le système microfluidique comporte un module de couplage entre l'unité de tri et celle d'encapsulation à vannes fluidiques, en référence aux figures 18 et 19.

[0064] Le système microfluidique 101 selon l'exemple de l'invention illustré à la figure 8 comporte, d'une part, une unité de tri par taille 110 d'amas A par filtration hydrodynamique se terminant par quatre microcanaux transverses de tri 111 à 114, et une unité d'encapsulation 120 subdivisée en quatre sous-unités d'encapsulation 121 à 124 respectivement couplées à ces microcanaux et véhiculant autant de catégories de tailles d'amas triés At.

[0065] Le principe de cette unité de tri 110 est illustré à la figure 12 et repose sur une focalisation des amas A à la paroi. Plus précisément en relation avec cette figure 12, on adapte les résistances fluidiques des microcanaux transverses 111 à 113 en choisissant un rapport de débits approprié entre le microcanal principal 115 et ces microcanaux transverses. De ce fait, les amas A ne peuvent pénétrer que dans l'un des microcanaux transverses 111 à 113, en fonction de leur taille et des résistances fluidiques respectives de ces microcanaux transverses, qui sont ainsi finement calculées pour déterminer la gamme de taille d'amas A pouvant pénétrer dans tel ou tel microcanal 111, 112, 113 ou 114.

[0066] La solution S permettant la focalisation des

amas A à la paroi est injectée en un microcanal secondaire 116 communiquant avec le microcanal principal 115 par des embranchements 117 à 119, et cette solution S peut être la même que celle contenant les amas A injectés à l'entrée E de l'unité 110, étant par exemple un milieu de culture ou de l'alginate.

[0067] L'unité de tri 110 permet ainsi de trier des amas de cellules A, tels que des îlots de Langerhans, selon les quatre catégories suivantes :

- îlots At plus petits que 100 μm ,
- îlots At de 100 à 200 μm ,
- îlots At de 200 à 300 μm , et
- îlots At dépassant les 300 μm .

[0068] En variante de la figure 12, il serait possible d'utiliser dans le système de la figure 8 l'unité de tri 210 par focalisation hydrodynamique de la figure 9, dans laquelle est visible l'entrée des amas A non triés, un dispositif de focalisation dynamique 211 utilisant un fluide focalisant S et, en sortie d'une zone de déviation 212, un premier microcanal de tri 213 véhiculant des amas triés At₁ déviés du fait qu'ils sont les plus petits et un second microcanal de tri 214 véhiculant les amas triés At₂ comme étant les plus gros suivant l'hypothèse que les amas de cellules suivent les lignes d'écoulement sur lesquelles leurs centres d'inertie sont positionnés. Un microcanal 215 de sortie pour une partie du fluide focalisant (dépourvu d'amas) est en outre agencé en sortie de cette zone 212.

[0069] Selon une autre variante de la figure 12, il serait également possible d'utiliser dans le système de la figure 8 l'unité de tri 310 par « DLD » des figures 10 et 11, utilisant un réseau de plots 311 qui est agencé de manière prédéterminée à l'intérieur d'un microcanal 312 et dont les caractéristiques géométriques imposent une taille critique Dc pour les amas de cellules. Les particules plus petites que Dc ne sont pas déviées par le réseau de plots 312 et suivent globalement les lignes d'écoulement du fluide, alors que les particules plus grosses que Dc sont déviées à chaque rangée transversale de plots 312 et de ce fait séparées des plus petites. On notera que plusieurs étages de tri peuvent être mis en cascade les uns à la suite des autres. Cette unité de tri 310 utilise une solution tampon de focalisation F, qui est injectée en même temps que la solution contenant les amas A à trier.

[0070] Comme visible à la figure 10, on récupère en sortie de cette unité 310, d'une part, la solution tampon F sans amas et, d'autre part, trois catégories d'amas triés At₁, At₂ et At₃ qui correspondent respectivement dans cet exemple de réalisation à des îlots de Langerhans plus petits que 200 μm , de 200 à 300 μm et plus gros que 300 μm . On a ainsi dans cet exemple mis en cascade deux étages de tri de caractéristiques géométriques différentes, permettant d'obtenir deux tailles critiques de tri Dc₁=200 μm et Dc₂=300 μm .

[0071] En revenant à la figure 8, les quatre microcanaux transverses de tri 111 à 114 véhiculant les amas

triés At débouchent respectivement sur les quatre sous-unités d'encapsulation 121 à 124, qui sont ici de type à jonction en T parcourues chacune par une huile H pour former les capsules C, en référence à la figure 15 qui montre de manière connue la formation d'une émulsion via le contact entre les deux phases d'huile et d'alginate se rencontrant dans cette jonction. En variante, il serait possible de remplacer les jonctions en T de la figure 8 par les dispositifs focalisants « MFFD » de la figure 16 faisant dans cet exemple converger deux phases huileuses et une phase d'alginate.

[0072] La figure 17 montre à titre d'exemple une structure possible d'un module de gélification 125 qui est utilisable dans chaque sous-unité d'encapsulation 121 à 124 de la figure 8, et qui est apte à transférer les capsules C à base d'alginate d'une phase huileuse vers une phase aqueuse pour les gélifier. Ce module 125 par exemple globalement en forme de « H » comprend :

- raccordés en amont d'une extrémité supérieure d'un pied vertical du H, un microcanal d'entrée 126 destiné à véhiculer des ions Ca^{2+} en solution aqueuse et, à l'autre extrémité inférieure de ce même pied, un dispositif d'encapsulation 127 de type « MFFD » à trois microcanaux convergents dont deux sont destinés à véhiculer la phase huileuse et le troisième de l'alginate pour former dans de l'huile les capsules C à base de Na-alginate, et
- raccordés en aval de l'extrémité supérieure de l'autre pied vertical du H, un microcanal de sortie 128 destiné à contenir un mélange de la solution aqueuse contenant les ions Ca^{2+} et ces capsules C transférées à base d'alginate et, à l'extrémité inférieure de cet autre pied, un microcanal 129 contenant la phase huileuse.

[0073] Le module de gélification 135 illustré dans la variante de la figure 17a comporte essentiellement :

- deux entrées 136 et 137 comprenant :
 - * un microcanal horizontal d'entrée 136 destiné à l'acheminement d'une phase huileuse contenant les amas de cellules A_t encapsulés en amont, et
 - * un microcanal vertical d'entrée 137 communiquant avec le précédent et destiné à y injecter transversalement une phase aqueuse contenant un agent, tel que du calcium, apte à gélifier par polymérisation les capsules enrobant ces amas (à base d'un composé hydrophile, tel que l'alginate) ; et
- deux sorties 138 et 139 qui sont séparées l'une de l'autre par un séparateur ou « mur » 140 (réalisé par exemple en silicium, en verre ou en un élastomère tel qu'un PDMS, à titre non limitatif) et qui comprennent de part et d'autre de ce mur 140 :

* une sortie supérieure 138 destinée à véhiculer la phase aqueuse contenant les amas de cellules A_t encapsulés, par migration de ces amas de la phase huileuse vers la phase aqueuse supérieure du fait du caractère hydrophile du matériau (e.g. l'alginate) constituant les capsules, et

* une sortie inférieure 139 destinée à l'extraction de la phase huileuse.

[0074] Le module de gélification 145 illustré à la figure 17b se différencie uniquement de celui de la figure 17a en ce qu'il est pourvu, dans la zone du microcanal horizontal d'entrée 136 qui est le siège de la migration précitée par attraction hydrophile, d'un agencement de piliers ou plots 146 modificateurs de trajectoire de type utilisé dans les dispositifs « DLD » (i.e. avec un espacement entre deux piliers 146 adjacents supérieur à la taille des amas A_t encapsulés) permettant d'amplifier, par l'effet du déplacement latéral déterministe s'ajoutant à cette migration, le déplacement latéral des amas A_t encapsulés de la phase huileuse vers la phase aqueuse supérieure.

[0075] Comme illustré à la figure 17c qui présente une variante de réalisation du séparateur 140 du module de gélification 135, 145 selon les figures 17a ou 17b, on peut avantageusement utiliser un séparateur 150 sous forme de « double mur » pour optimiser la séparation des phases aqueuse et huileuse. Ce séparateur 150 se distingue uniquement du précédent en ce qu'il est formé de deux parois ou cloisons superposées 151 et 152 séparées l'une de l'autre par un canal interstitiel central 153, ce qui permet de récupérer en sortie du module 135 ou 145 des phases huileuse et aqueuse qui sont chacune plus pures et d'éliminer par ce canal interstitiel 153 l'interface centrale solution aqueuse/ huile. Plus précisément, la largeur de ce canal 153 est prévue pour que ce dernier ne véhicule pas les amas A_t encapsulés hors du module de gélification 135, 145. On notera que ce séparateur à double cloison 150 permet notamment de réduire les traces de solution aqueuse dans l'huile, autorisant ainsi une réutilisation de celle-ci.

[0076] En variante de ces figures 17, 17a, 17b et 17c, on peut par exemple utiliser, à titre non limitatif, un module de gélification 225 tel que celui inclus dans l'unité d'encapsulation 220 à trois couches Alginate-Poly-L-Lysine-Alginate selon la figure 21, où la gélification se fait directement dans du 1-undécanol et non pas en phase aqueuse.

[0077] Comme visible à cette figure 21, les capsules sont produites au niveau d'un dispositif d'encapsulation 221 du type « MFFD », puis gélifiées dans le module 225 par introduction d'un flux de 1-undécanol contenant du CaCl_2 . Elles sont ensuite transférées en phase aqueuse et rincées, au niveau d'un premier module de rinçage 226 en forme de « H ».

[0078] Puis les capsules sont mises en contact avec une solution de polycations de PLL (Poly-L-Lysine) dans

un canal en forme de serpent 227, qui permet d'ajuster le temps d'incubation des capsules dans cette solution de PLL. Les capsules sont par la suite rincées dans une solution de NaCl, pour éliminer le PLL non lié dans un second module de rinçage 228, et l'on élimine également ensuite la solution de NaCl de rinçage dans les microcanaux 229.

[0079] En dernière étape, les capsules sont recouvertes d'une couche externe d'alginate dans un module d'accrochage 230, pour l'obtention en sortie de l'unité 220 des capsules à trois couches Alginate-PLL-Alginate.

[0080] La figure 13 illustre une structure utilisable d'un module de transfert 20 d'amas triés de cellules (e.g. des îlots de Langerhans) d'un milieu de culture vers une solution d'alginate utilisée pour l'encapsulation, qui peut être avantageusement inclus dans un système microfluidique selon l'invention. Les résistances fluidiques et les tailles respectives des microcanaux formant ce module de transfert 20 sont ajustées de telle sorte que ces amas triés soient forcés de s'écouler dans le microcanal principal et de passer ainsi du milieu de culture vers la solution d'alginate (ou d'un autre polymère).

[0081] Les figures 18 et 19 illustrent deux exemples préférentiels de modules de couplage 30 et 40 qui peuvent être chacun couplés à l'un des étages de tri 111 à 114 de la figure 8 et à chaque sous-unité correspondante d'encapsulation 121 à 124 de cette même figure 8. Chaque module de couplage 30, 40 est conçu pour maintenir un régime fluide laminaire à la fois dans l'unité de tri 110 et dans l'unité d'encapsulation 120, en faisant communiquer sélectivement ces deux unités 110 et 120 entre elles.

[0082] En référence à ces deux figures 18 et 19, le module de couplage 30, 40 correspondant comprend dans les deux cas un microréservoir tampon de stockage 31, 41 des amas triés, où débouche un microcanal de tri 111 à 114 et qui est relié sélectivement par l'intermédiaire d'une vanne fluide 32, 42, à une sous-unité d'encapsulation 121 à 124 par un microcanal de sortie 33, 50 destiné à véhiculer les amas triés et concentrés lorsque la vanne 32, 42 est ouverte. Chaque microréservoir 31, 41 est en outre pourvu d'une pluralité de fins microcanaux transverses de sortie 34, 44 pour permettre l'évacuation de la phase contenant les amas sans ces derniers (e.g. l'évacuation du milieu de culture ou de la solution d'alginate), lorsque la vanne 32, 42 est fermée.

[0083] La fermeture de la vanne 32, 42 permet de stocker et surtout de concentrer les amas de manière que leur concentration dans la solution d'encapsulation soit suffisante pour limiter le nombre de capsules vides formées. Les microcanaux fins 34, 44 permettent de faire en sorte que la fermeture de la vanne 32, 42 ne modifie pas les lignes d'écoulement du fluide en amont dans l'étage de tri correspondant (la taille de ces microcanaux 34, 44 est telle que les amas ne peuvent pas y pénétrer et sont donc forcés de se concentrer dans le microréservoir 31, 41).

[0084] Plus précisément en référence à la figure 18,

on utilise dans cet exemple une vanne 32 de type « bulle d'air », dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées thermiquement au moyen d'une résistance chauffante 32a incorporée à une puce, de la manière suivante. Lorsque l'air est maintenu à température ambiante, la vanne 32 est ouverte. En augmentant la température de l'air contenu dans une chambre d'activation 32b de la vanne, on augmente la pression du gaz qui s'introduit dans le microcanal de sortie 33 et bloque le passage du fluide.

[0085] Plus précisément en référence à la figure 19, on utilise dans cet exemple une vanne 42 de type à gel bloquant pouvant être dissous et de préférence à gel d'alginate. La fermeture de la vanne 42 s'effectue par formation d'un gel d'alginate 42a par mise en contact d'une solution d'alginate avec des ions Ca^{2+} . L'ouverture de la vanne 42 correspond à la dissolution du gel d'alginate 42a par une solution d'EDTA ou de tout autre chélateur des ions Ca^{2+} de type citrate de sodium ou EGTA. En contrôlant les pressions relatives des solutions d'EDTA et de Ca^{2+} , on contrôle la quantité de chaque espèce de manière que si l'EDTA est en excès, alors tous les ions Ca^{2+} sont chélatés et le gel d'alginate 42a est dissous par l'EDTA, et qu'au contraire les ions Ca^{2+} libres permettent la formation du gel.

[0086] La position du gel 42a est déterminée par les pressions relatives des phases d'alginate, de Ca^{2+} et d'EDTA. Pour éviter que le microcanal 45 véhiculant l'alginate ne se bouche, on peut introduire une faible quantité d'EDTA en même temps que cet alginate.

[0087] Une fois l'étape de concentration des amas terminée et le gel d'alginate 42a dissous, la pression de circulation de l'EDTA (injecté dans deux microcanaux différents 46 et 47 opposés par rapport au microcanal de sortie 43) et la pression de circulation des ions Ca^{2+} (injectés dans un microcanal 48 adjacent à un microcanal 49 véhiculant le milieu de culture) peuvent être quasiment nulles: seuls l'alginate et ce milieu de culture, complètement inoffensifs pour la viabilité des amas, circulent alors dans la chambre 43. Cette dernière est en outre pourvue d'une sortie 50 pour l'acheminement des amas triés et concentrés vers la sous-unité d'encapsulation 121 à 124 correspondante, et d'une sortie 51 équipée de fins microcanaux de filtrage 51a pour l'évacuation des seuls ions Ca^{2+} .

[0088] On notera que le principal avantage de ce type de vanne 42 est qu'il n'y a aucune complication d'ordre technologique pour l'incorporer au microsystème selon l'invention.

[0089] La figure 20 illustre schématiquement une variante d'unité d'encapsulation 320 selon l'invention, suite à un tri par taille effectué par déplacement latéral déterministe (« DLD »). Les amas triés At de cellules sont encapsulés par fluide passif, l'encapsulation étant générée à la rupture de l'interface phase aqueuse - huile lorsqu'une surpression locale apparaît.

[0090] Plus précisément, cette unité d'encapsulation 320 comporte :

- une première entrée 321 de phase aqueuse incluant les amas triés At en solution (e.g. dans du sérum physiologique, dans un milieu de culture ou dans de l'alginate, à titre non limitatif), cette entrée 321 définissant un microcanal horizontal 321a,
- une seconde entrée 322 d'une phase non miscible avec cette phase aqueuse (e.g. une huile, de l'undécanol, du « FC »), cette entrée 322 étant prévue à l'opposé et en contrebas de la première entrée 321,
- deux sorties opposées 323 et 324 pour la phase aqueuse introduite par la première entrée 321, qui sont prévues en dessous de cette dernière mais au-dessus de la seconde entrée 322 et qui sont reliées entre elles par deux microcanaux latéraux 323a et 324a (horizontaux) communiquant avec un microcanal vertical 325 prolongeant à angle droit le microcanal 321 a, et
- une sortie 326 pour l'évacuation de la phase non miscible ou huileuse contenant les amas At de cellules encapsulés qui est prévue à l'opposé et à la même hauteur que la seconde entrée 322 de cette phase non miscible, formant avec celle-ci un microcanal inférieur 327 d'encapsulation qui communique avec le microcanal vertical 325 de sorte à recevoir par gravité les amas provenant de la première entrée 321.

[0091] On notera que cette unité d'encapsulation 320, qui est formée en trois dimensions (en ce sens que les entrées et sorties microfluidiques 321, 322, 323, 324 et 326 ne sont pas situées dans un même plan), est apte à former les capsules C non seulement par la surpression locale précitée résultant de l'obstruction des deux microcanaux latéraux 323a et 324a, mais aussi par la force de sédimentation des amas de cellules due à la gravité.

[0092] En conclusion et comme l'illustre à titre d'exemple la figure 14, le procédé de tri/ encapsulation de l'invention permet de coupler en continu et de manière automatisée un nombre donné de sous-unités d'encapsulation 121-124 à autant d'étages de tri 111-114 d'une unité de tri 110 de préférence par taille, via un nombre correspondant de modules de couplage 30, 40. On peut ainsi par exemple trier des îlots de Langerhans en quatre catégories respectivement associées à des tailles de capsules en rapport :

- îlots de taille inférieure à 100 μm triés en 111 et encapsulés en 121 par des capsules de 200 μm de diamètre ;
- îlots de taille comprise entre 100 et 200 μm triés en 112 et encapsulés en 122 par des capsules de 300 μm de diamètre ;
- îlots de taille comprise entre 200 et 300 μm triés en 113 et encapsulés en 123 par des capsules de 400 μm de diamètre ; et
- îlots de taille supérieure à 300 μm triés en 114 et encapsulés en 124 par des capsules de 500 μm de diamètre.

[0093] De cette manière, on comprend que le procédé selon l'invention permet d'adapter au plus près la taille des capsules formées, suite au tri des amas de cellules, à la taille des diverses catégories d'amas triés. Il en résulte avantageusement :

- une minimisation de la quantité de polymère à former autour des amas et donc du temps de réponse de ces derniers,
- une optimisation de la viabilité des amas encapsulés, notamment du fait que la diffusion de l'oxygène y est plus rapide, ce qui réduit les risques d'apparition de zones nécrosées lors des transplantations, et
- une minimisation du volume de capsules à transplanter, ce qui peut permettre l'implantation des capsules dans des zones plus propices à la revascularisation des tissus.

Références bibliographiques citées :

[0094]

1. De Vos, Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. Transplantation, 1996. 62: p. 893-899.
2. Lehmann, R., Superiority of small islets in human islet transplantation. Diabetes, 2007. 56: p. 594-603.
3. Zimmermann, Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM-, and AFM-imaging. Biomaterials, 2003. 24: p. 2083-2096.
4. Goosen, Electrostatic droplet generation for encapsulation of somatic tissue: assessment of high-voltage power supply. Biotechnol.Prog., 1997. 13 (497-502).
5. Seifert, Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. Biotechnol.Prog., 1997. 13: p. 562-568.
6. Huang, Continuous particles separation through deterministic lateral displacement. Science, 2004. 304(987-990).
7. Davis, Deterministic hydrodynamics: taking blood apart. PNAS, 2006. 103(40): p. 14779-14784.
8. Inglis, Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement. Lab on a chip, 2006. 6: p. 655-658.
9. Yamada, Microfluidic particle sorter employing flow splitting and recombining. Anal.Chem, 2006. 78: p. 1357-1362.
10. Yamada, Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. Lab on a chip, 2005. 5: p. 1233-1239.
11. Yamada, Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. Anal.Chem, 2004. 76: p. 5465-5471.
12. Takagi, Continuous particle separation in a mi-

crochannel having asymmetrically arranged multiple branches. Lab on a chip, 2005. 5: p. 778-784.

13. Site Internet de la société Union Biometrica dont l'adresse est http://www.unionbio.com/applications/app_notes/app_islet.html

14. Thorsen, Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. Physical Review Letters, 2001. 86(18): p. 4163-4166.

15. Anna, Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. Applied physics letters, 2003. 82(3): p. 364-366.

16. Sugiura, Interfacial tension driven monodispersed droplet formation from microfabricated channel array. Langmuir, 2001. 17: p. 5562-5566.

17. Sugiura, Size control of calcium alginate beads containing living cells using micronozzle array. Biomaterials, 2005. 26: p. 3327-3331.

18. Wyman, Immunoisolating pancreatic islets by encapsulation with selective withdrawal. Small, 2007. 3(4): p. 683-690.

Revendications

1. Système microfluidique (1, 101) comportant un substrat (3) dans lequel est gravé un réseau de microcanaux comprenant une unité de tri (110, 210, 310) de cellules et autour duquel est scellé un capot de protection (2), **caractérisé en ce que** l'unité de tri comporte des moyens de déviation (211, 311) aptes à séparer lors de leur écoulement des amas (A) de cellules peu cohésifs de taille variant de 20 μm à 500 μm et de 20 à 10 000 cellules chacun environ, tels que des îlots de Langerhans, au moins deux microcanaux de tri (111 à 114) agencés en parallèle en sortie de ladite unité étant respectivement conçus pour véhiculer autant de catégories d'amas triés (At) vers une unité d'encapsulation (120, 220, 320) de ces derniers également formée dans ledit réseau, ladite unité de tri (110, 210, 310) comprenant de préférence au moins un étage de tri par taille desdits amas (A) qui est conçu pour générer dans lesdits microcanaux de tri (111 à 114) respectivement au moins deux catégories de tailles pour lesdits amas triés (At).
2. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** lesdits moyens de déviation (211, 311) dudit ou de chaque étage de tri sont hydrodynamiques à fluide passif, étant de préférence de type à focalisation hydrodynamique, de type à déplacement latéral déterministe (« DLD ») au moyen d'un arrangement de plots (311) de déviation que comporte au moins un microcanal (312) de cet étage, ou bien de type à filtration hydrodynamique au moyen de microcanaux de filtration (111 à 114) agencés transversalement à un microcanal principal (115).
3. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** lesdits moyens de déviation dudit ou de chaque étage de tri sont de type hydrodynamiques couplés à des forces électrostatiques, magnétiques ou à des ondes électromagnétiques ou acoustiques.
4. Système microfluidique (1, 101) selon une des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'une** unité d'encapsulation (120, 220, 320), apte à encapsuler de manière automatisée lesdits amas triés (At) en fonction de leur catégorie, est en outre formée dans ledit réseau en communication fluide avec lesdits microcanaux de tri (111 à 114), cette unité d'encapsulation étant apte à former en continu autour de chaque amas trié une capsule (C) monocouche ou multicouches biocompatible, mécaniquement résistante et à perméabilité sélective.
5. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** l'unité d'encapsulation (120) comprend une pluralité de sous-unités d'encapsulation (121 à 124) qui sont respectivement agencées en parallèle en communication avec lesdits microcanaux de tri (111 à 114) pour former, pour chaque catégorie de taille d'amas triés (At) y circulant, une capsule (C) de taille prédéterminée conçue pour envelopper au plus près chaque amas de cette catégorie.
6. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** chaque sous-unité d'encapsulation (121 à 124) comporte un dispositif de formation (127, 221) desdites capsules (C) choisi dans le groupe constitué par les dispositifs à jonction en « T », les dispositifs microfluidiques de focalisation d'écoulement « MFDD », les dispositifs à réseau de microcanaux structurés « MC array » et les dispositifs à réseau de microbuses « MN array ».
7. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** chaque sous-unité d'encapsulation (121 à 124) comporte un échangeur de matière entre une phase aqueuse (321) comprenant lesdits amas triés (At) au sein de chaque catégorie et une phase non miscible (322) avec cette phase aqueuse, par exemple huileuse, cet échangeur étant conçu pour former les capsules (C) par rupture de l'interface entre ces deux phases due à une surpression.
8. Système microfluidique (1, 101) selon une des revendications 4 à 7, **caractérisé en ce que** ladite unité d'encapsulation (120, 220) comprend en outre des moyens de gélification (125, 135, 145, 225) des capsules (C) formées, comprenant un échangeur de matière constitué de microcanaux et dédié au transfert de ces capsules d'une phase d'encapsulation

les contenant, par exemple de type huile-alginate, vers une phase de gélification aqueuse ou non.

9. Système microfluidique (1, 101) selon une des revendications 4 à 7, **caractérisé en ce qu'**est en outre formé dans ledit réseau de microcanaux un module microfluidique de transfert (20) conçu pour transférer lesdits amas triés (At) d'un milieu de culture les contenant vers une phase d'encapsulation destinée à les contenir dans ladite unité d'encapsulation (120, 220, 320), ce module de transfert étant en communication fluide avec chacun desdits microcanaux de tri (111 à 114) et étant conçu pour minimiser les pertes de charge dans ladite unité de tri (110, 210, 310). 5 10 15
10. Système microfluidique (1, 101) selon une des revendications 4 à 9, **caractérisé en ce qu'**il comprend en outre un module de couplage (30, 40) de ladite unité de tri (110, 210, 310) à ladite unité d'encapsulation (120, 220, 320), qui est conçu pour maintenir un régime fluide laminaire dans ces deux unités en faisant communiquer directement ou bien sélectivement l'unité d'encapsulation avec l'unité de tri. 20 25
11. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 10, **caractérisé en ce que** ledit module de couplage est constitué de microcanaux intermédiaires qui relient respectivement lesdits microcanaux de tri (111 à 114) à ladite unité d'encapsulation (120, 220, 320) et qui présentent des dimensions et une géométrie adaptées pour le maintien dudit régime laminaire en amont et en aval. 30 35
12. Système microfluidique (1, 101) selon la revendication 10, **caractérisé en ce que** ledit module de couplage (30, 40) comprend des microréservoirs tampon de stockage (31, 41) desdits amas triés (At), dans chacun desquels débouche l'un desdits microcanaux de tri (111 à 114) et qui sont chacun reliés sélectivement à ladite unité d'encapsulation (120, 220, 320) par un microcanal de sortie (33, 43) qui est destiné à véhiculer lesdits amas triés et concentrés et qui équipé d'une vanne fluide (32, 42) par exemple de type à bulle d'air ou à gel bloquant pouvant être dissous, de sorte que l'ouverture et la fermeture de cette vanne abaisse et élève respectivement la concentration desdits amas triés dans chaque microréservoir en fonction du nombre de capsules (C) en cours de formation dans ladite unité d'encapsulation, chaque microréservoir (31, 41) étant en outre de préférence pourvu d'une pluralité de fins microcanaux transverses de sortie (34, 44) qui sont conçus pour permettre l'évacuation de la phase contenant lesdits amas (At) à l'exception de ces derniers, lorsque ladite vanne (32, 42) est fermée. 40 45 50 55

13. Procédé de tri d'amas (A) peu cohésifs de cellules de taille variant de 20 μm à 500 μm et de 20 à 10 000 cellules environ, tels que des îlots de Langerhans, **caractérisé en ce qu'**il consiste à faire circuler ces amas dans un réseau de microcanaux d'un système microfluidique (1, 101) de géométrie adaptée à la taille et au nombre de ces amas à séparer, et à les dévier les uns des autres selon l'un de leurs paramètres, tel que leur taille, de manière à les diriger vers au moins deux microcanaux de tri (111 à 114) véhiculant en parallèle autant de catégories d'amas triés (At) en vue de leur encapsulation dans ce même système, et **en ce que** de préférence l'on utilise au moins un étage de tri par taille desdits amas (A) pour générer dans lesdits microcanaux de tri (111 à 114) respectivement au moins deux catégories de tailles pour lesdits amas triés (At), chaque étage utilisant : 5 10 15 20 25

- une déviation hydrodynamique à fluide passive, de préférence par focalisation hydrodynamique, par déplacement latéral déterministe (« DLD ») ou par filtration hydrodynamique, ou
- une déviation hydrodynamique couplée à des forces électrostatiques, magnétiques ou à des ondes électromagnétiques ou acoustiques.

14. Procédé de tri selon la revendication 13, **caractérisé en ce que** l'on encapsule en outre de manière automatisée lesdits amas triés (At) en parallèle en fonction de leur catégorie, en formant en continu autour de chaque amas trié une capsule (C) monocouche ou multicouches biocompatible, mécaniquement résistante et à perméabilité sélective, cette capsule étant par exemple à base d'un hydrogel d'alginate. 30 35
15. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon la revendication 14, **caractérisé en ce que** l'on forme, pour chaque catégorie de taille d'amas triés (At), une capsule (C) de taille prédéterminée enveloppant au plus près chaque amas de cette catégorie, de préférence avec une taille de capsule d'environ $D_a + 20 \mu\text{m}$ à $D_a + 150 \mu\text{m}$ pour une catégorie d'amas triés selon une taille critique inférieure à une valeur D_a . 40 45
16. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon la revendication 14 ou 15, **caractérisé en ce que** l'on forme lesdites capsules (C) pour chaque catégorie d'amas trié (At) par un dispositif (127, 221) choisi dans le groupe constitué par les dispositifs à jonction en « T », les dispositifs microfluidiques de focalisation d'écoulement « MFDD », les dispositifs à réseau de microcanaux structurés « MC array » et les dispositifs à réseau de microbuses « MN array », et **en ce que** de préférence l'on forme lesdites capsules (C) par échange de matière entre une phase aqueuse (321) comprenant lesdits amas triés (At) 50 55

au sein de chaque catégorie et une phase non miscible (322) avec cette phase aqueuse, par exemple huileuse, la rupture de l'interface entre ces deux phases par une surpression générant ces capsules.

17. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon une des revendications 14 à 16, **caractérisé en ce que** l'on gélifie ensuite les capsules (C) formées, par un transfert de ces capsules et de la phase d'encapsulation les contenant, par exemple de type huile-alginate, vers une phase de gélification aqueuse ou non. 5
18. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon une des revendications 14 à 17, **caractérisé en ce que**, avant chaque encapsulation, l'on transfère lesdits amas triés (At) d'un milieu de culture les contenant vers la phase d'encapsulation destinée à les contenir, pour minimiser les pertes de charge lors du tri. 15
19. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon une des revendications 14 à 18, **caractérisé en ce qu'il** comprend en outre un couplage fluide entre le tri et l'encapsulation ayant pour effet de maintenir un régime fluide laminaire dans les microcanaux correspondants, ce couplage faisant communiquer directement ou bien sélectivement lesdits amas triés (At) avec la phase d'encapsulation. 20
20. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon la revendication 19, **caractérisé en ce que** l'on réalise ce couplage au moyen de fins microcanaux intermédiaires qui présentent des dimensions et une géométrie adaptées pour le maintien du régime laminaire lors du tri et lors de l'encapsulation. 25
21. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon la revendication 19, **caractérisé en ce que** l'on réalise ce couplage en réglant la concentration de chaque catégorie d'amas triés (At) dans un microréservoir tampon de stockage (31, 41) de ces amas communiquant avec l'un desdits microcanaux de tri (111 à 114) et relié sélectivement par une vanne fluide (32, 42) à un microcanal de sortie (33, 43) véhiculant les amas triés et concentrés, l'ouverture et la fermeture de cette vanne abaissant et élevant respectivement la concentration des amas triés dans le microréservoir en fonction du nombre de capsules (C) en cours de formation, pour minimiser la formation de capsules vides, ce microréservoir étant pourvu d'une pluralité de fins microcanaux transverses de sortie (34, 44) conçus pour évacuer la phase contenant ces amas à l'exception de ces derniers, lorsque la vanne est fermée. 30
22. Procédé de tri et d'encapsulation en continu selon une des revendications 14 à 21, **caractérisé en ce** 35

que lesdits amas de cellules (At) sont des îlots de Langerhans et sont encapsulés avec une taille de capsules (C) variant de 70 μm à 200 μm pour les îlots triés selon une taille inférieure à 50 μm , avec une taille de capsules pouvant atteindre 650 μm pour les plus gros îlots triés. 40

23. Utilisation d'un système microfluidique (1, 101) selon une des revendications 1 à 12 pour trier soit des cellules, bactéries, organelles, liposomes, soit des amas de cellules (At), de préférence selon des catégories d'intérêt via des molécules d'adhésion dans le premier cas, ou bien selon des catégories de tailles dans le cas d'amas de cellules, puis pour les encapsuler en continu et de manière automatisée pour chaque catégorie triée. 45

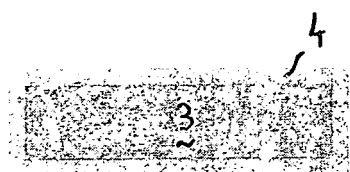


Fig. 1

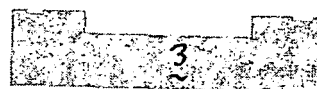


Fig. 5

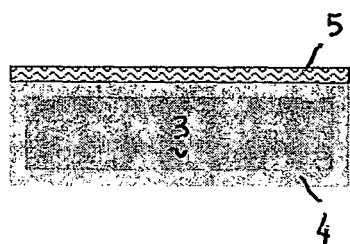


Fig. 2

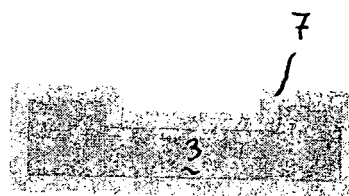


Fig. 6

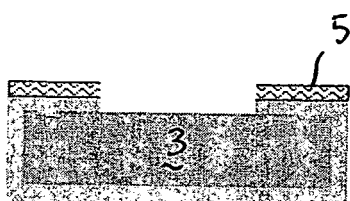


Fig. 3

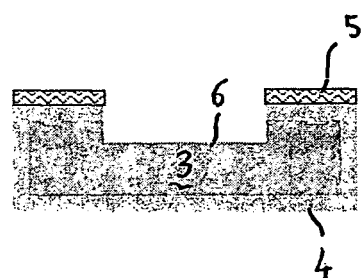


Fig. 4

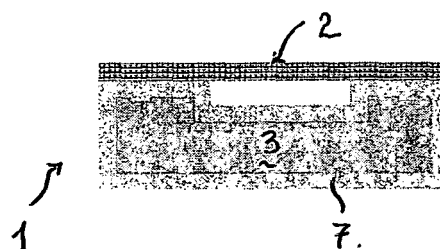


Fig. 7

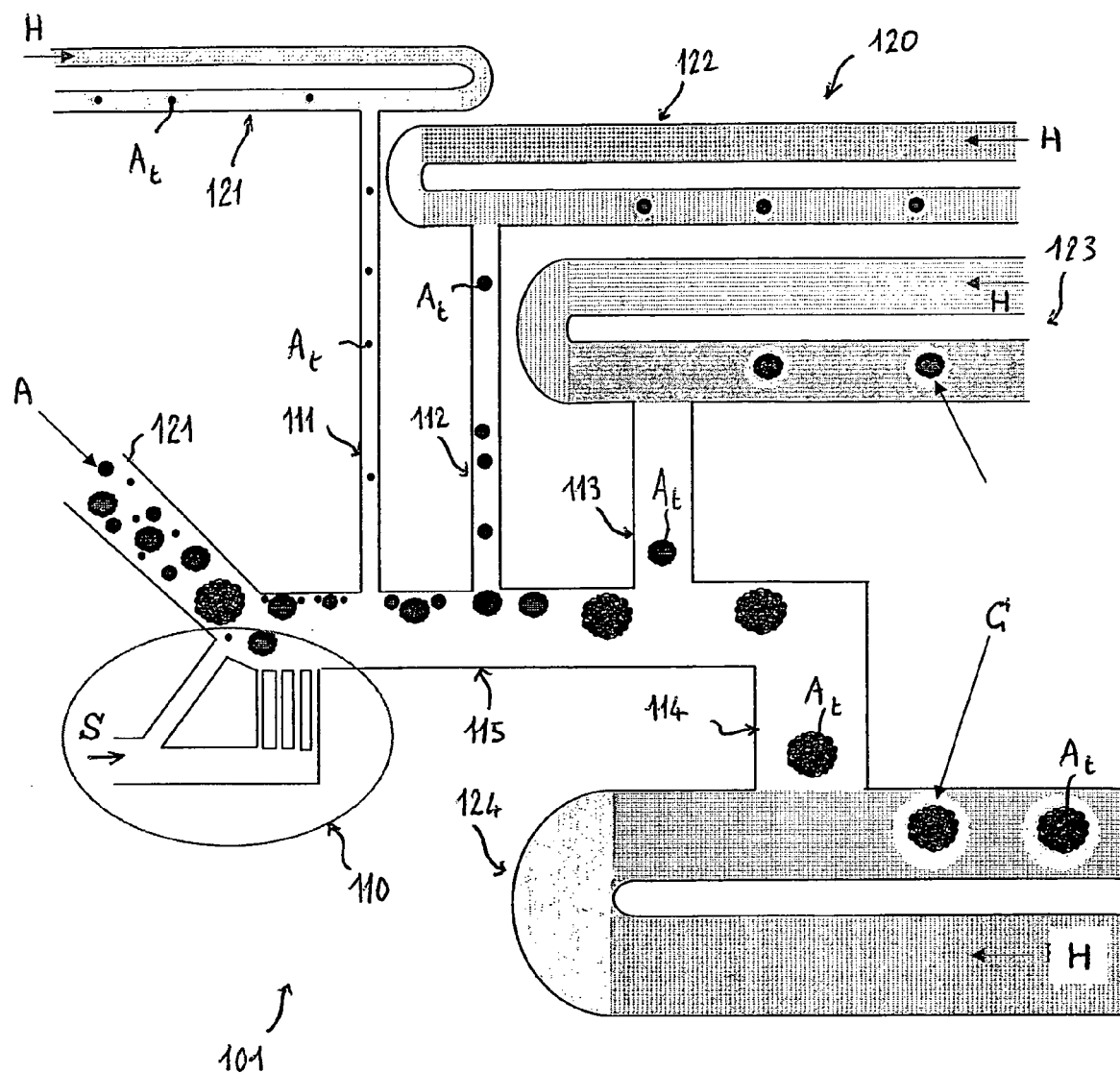


Fig. 8

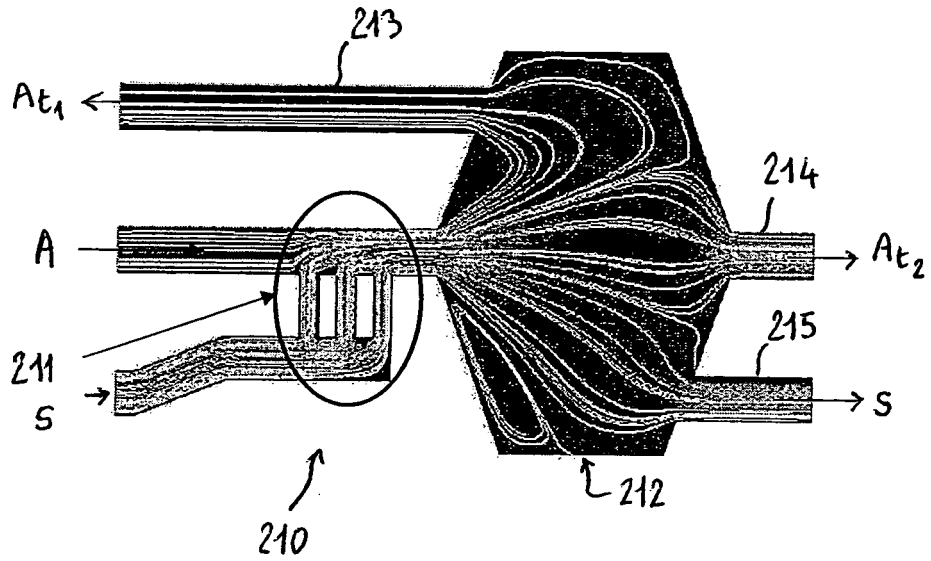


Fig. 9

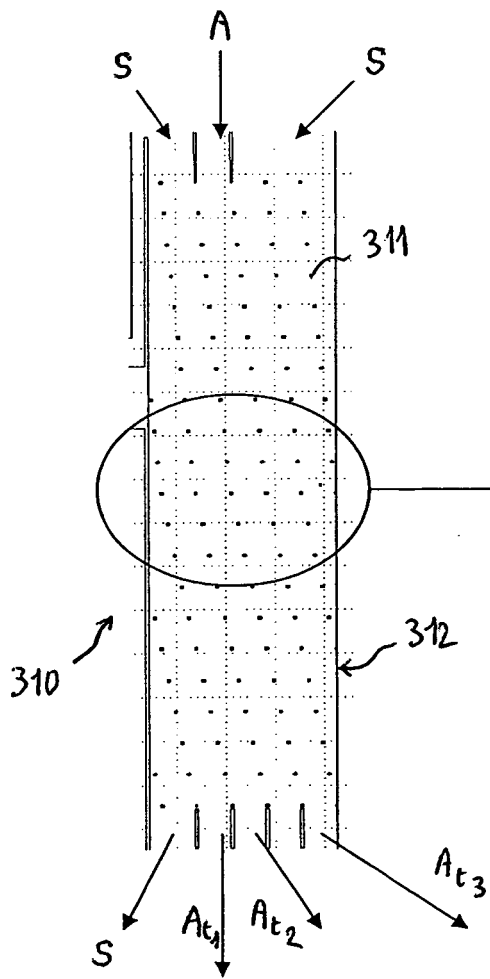


Fig. 10

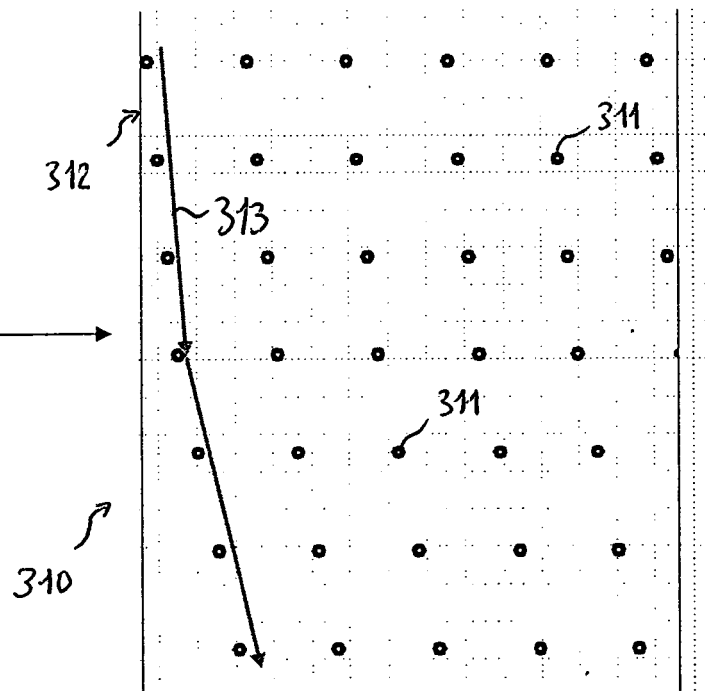


Fig. 11

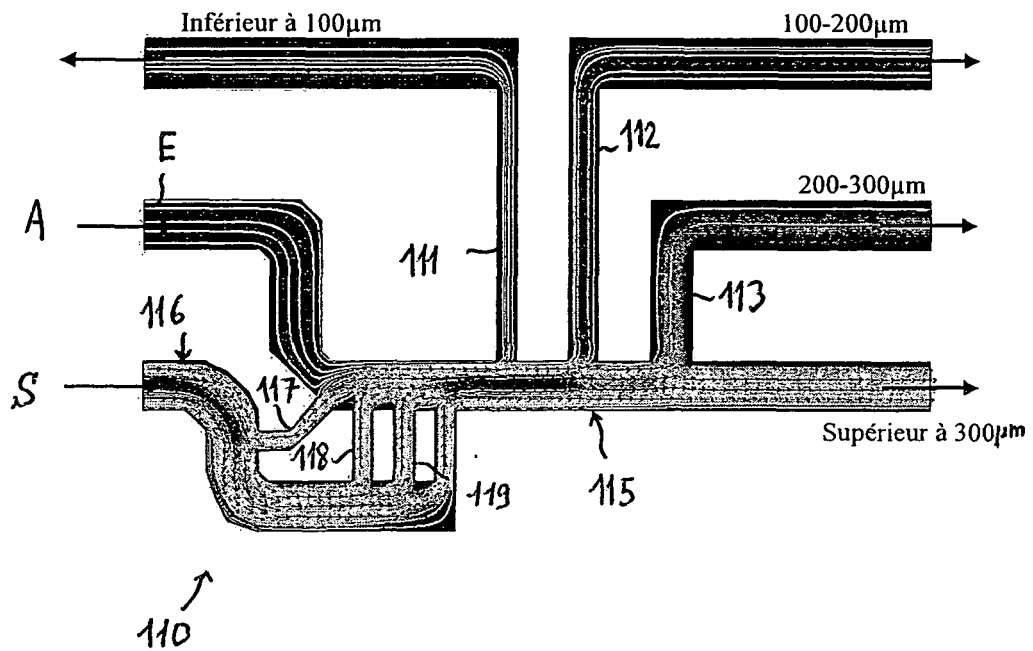


Fig. 12

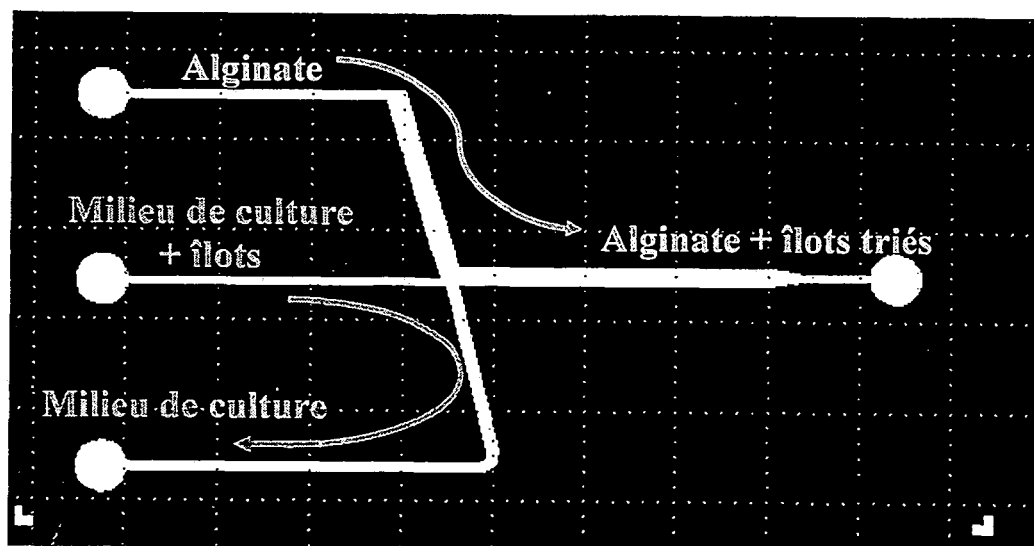


Fig. 13

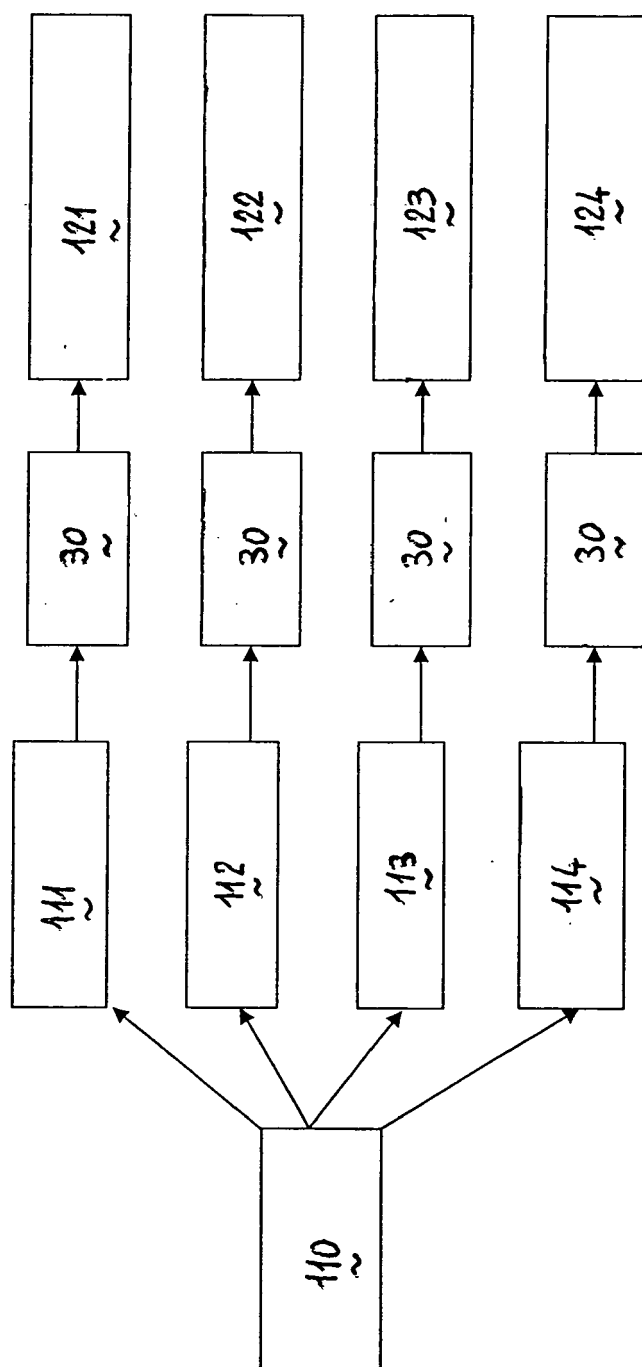
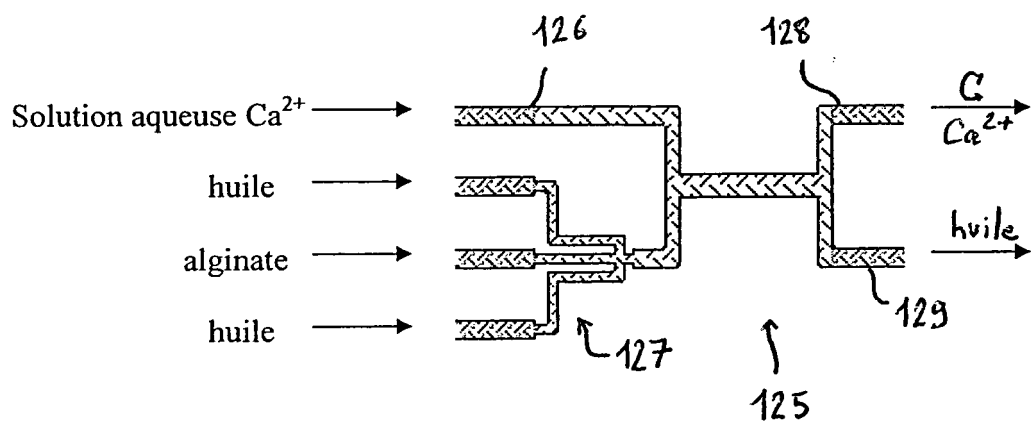
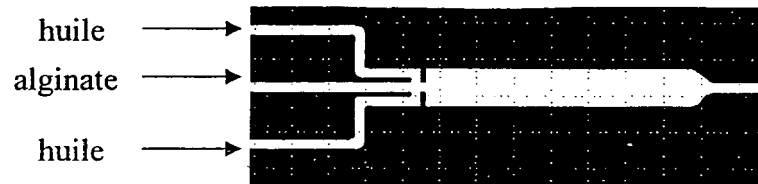
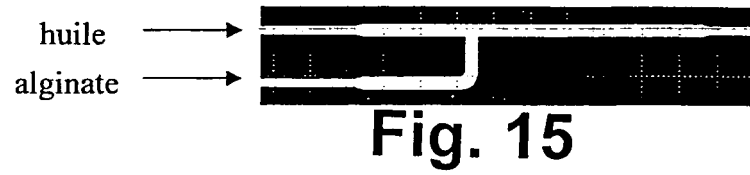


Fig. 14



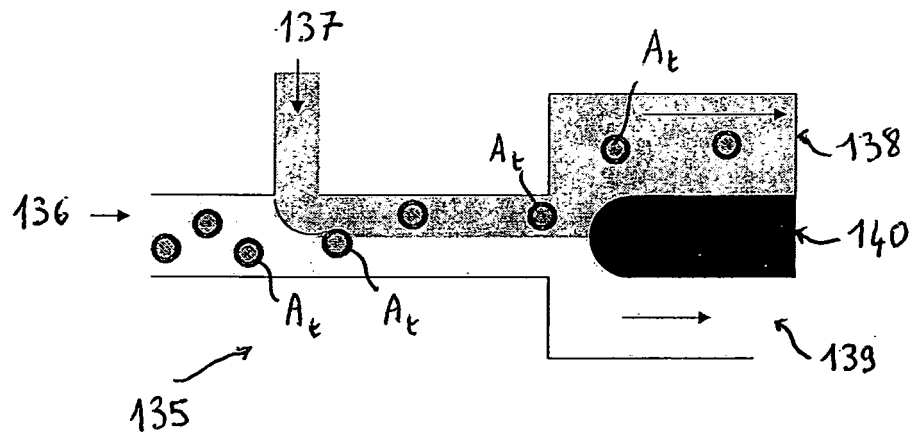


Fig. 17 a

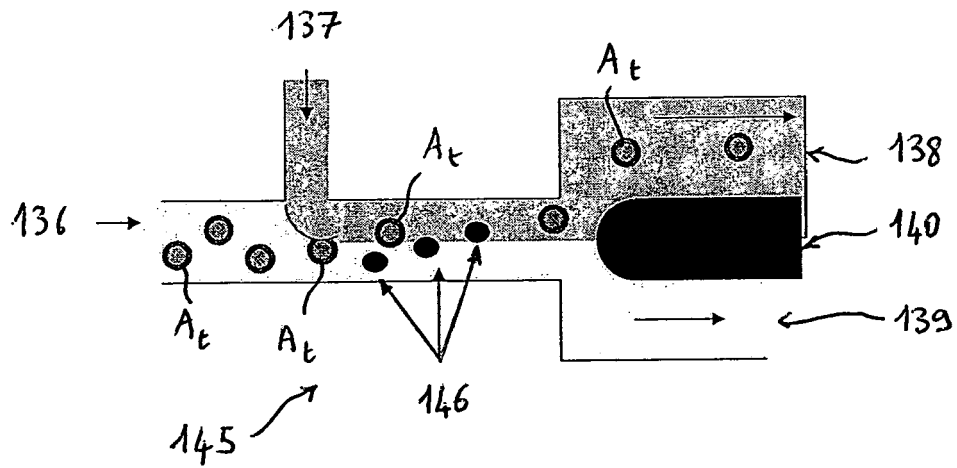


Fig. 17 b

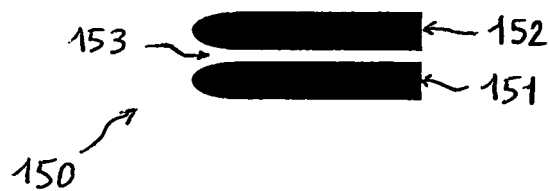


Fig. 17 c

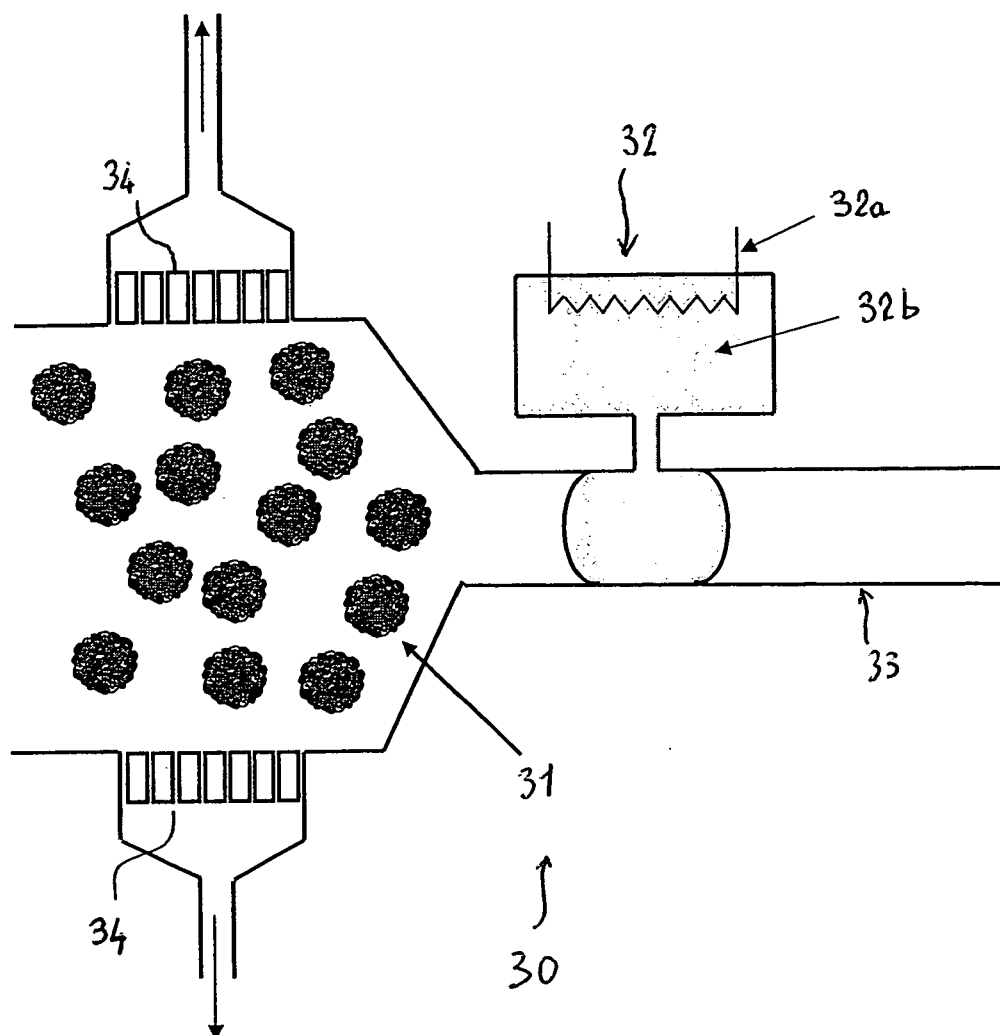


Fig. 18

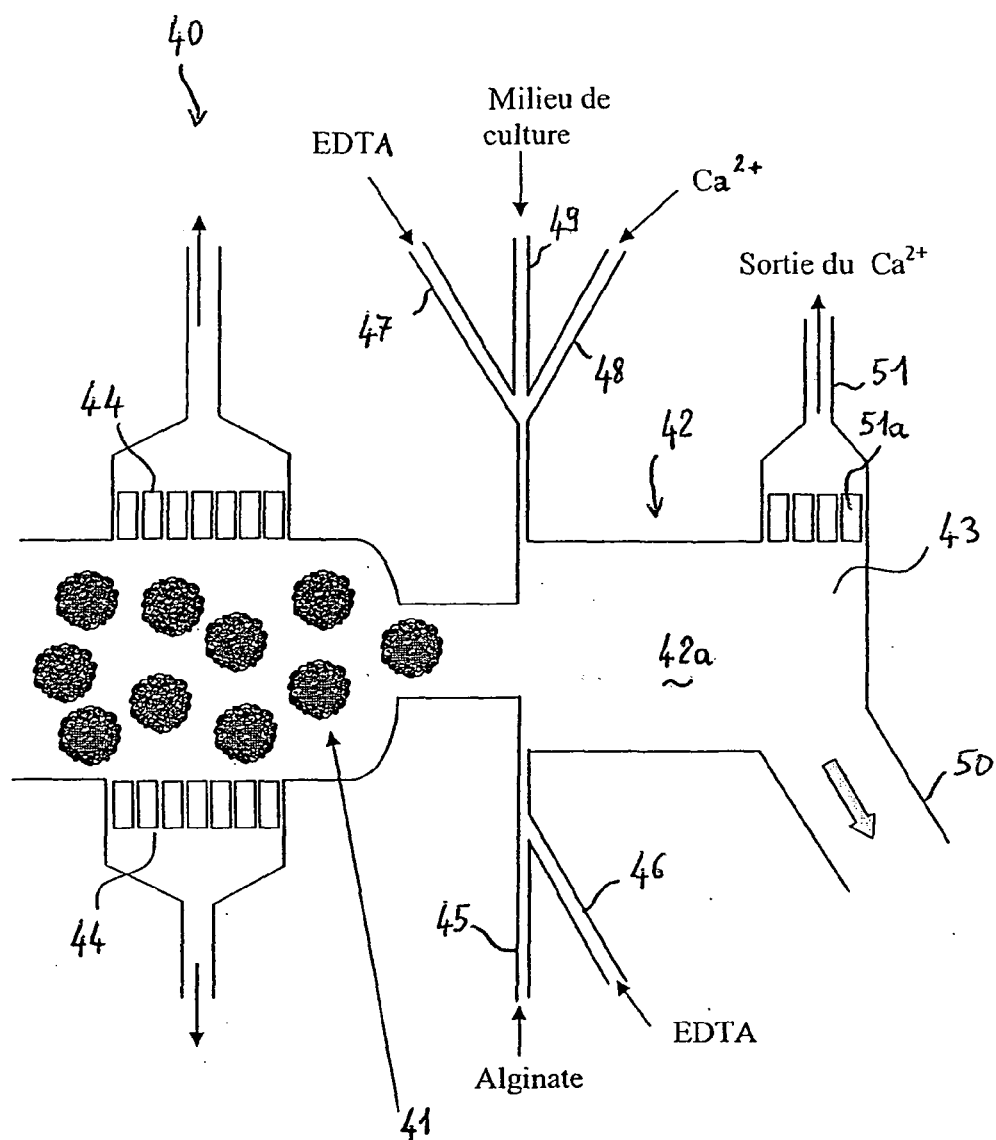


Fig. 19

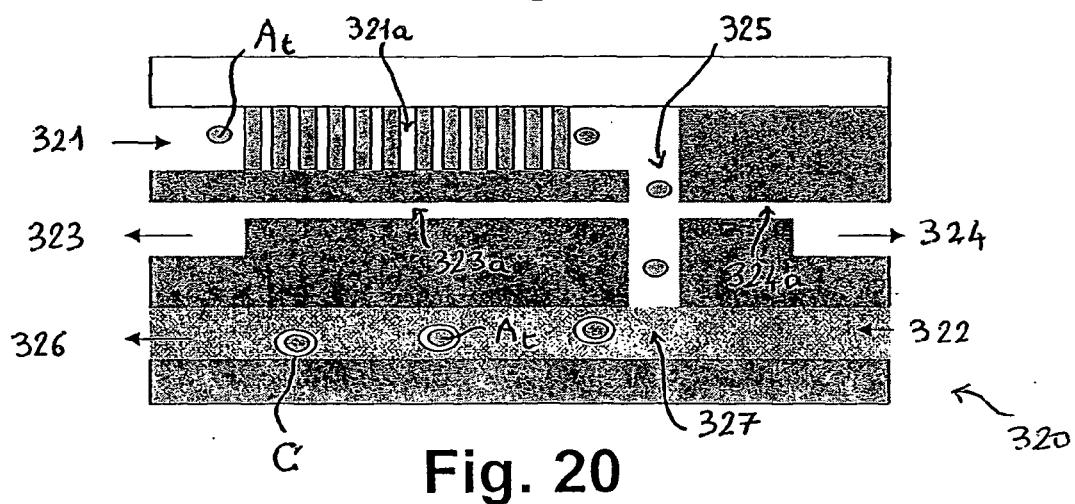


Fig. 20

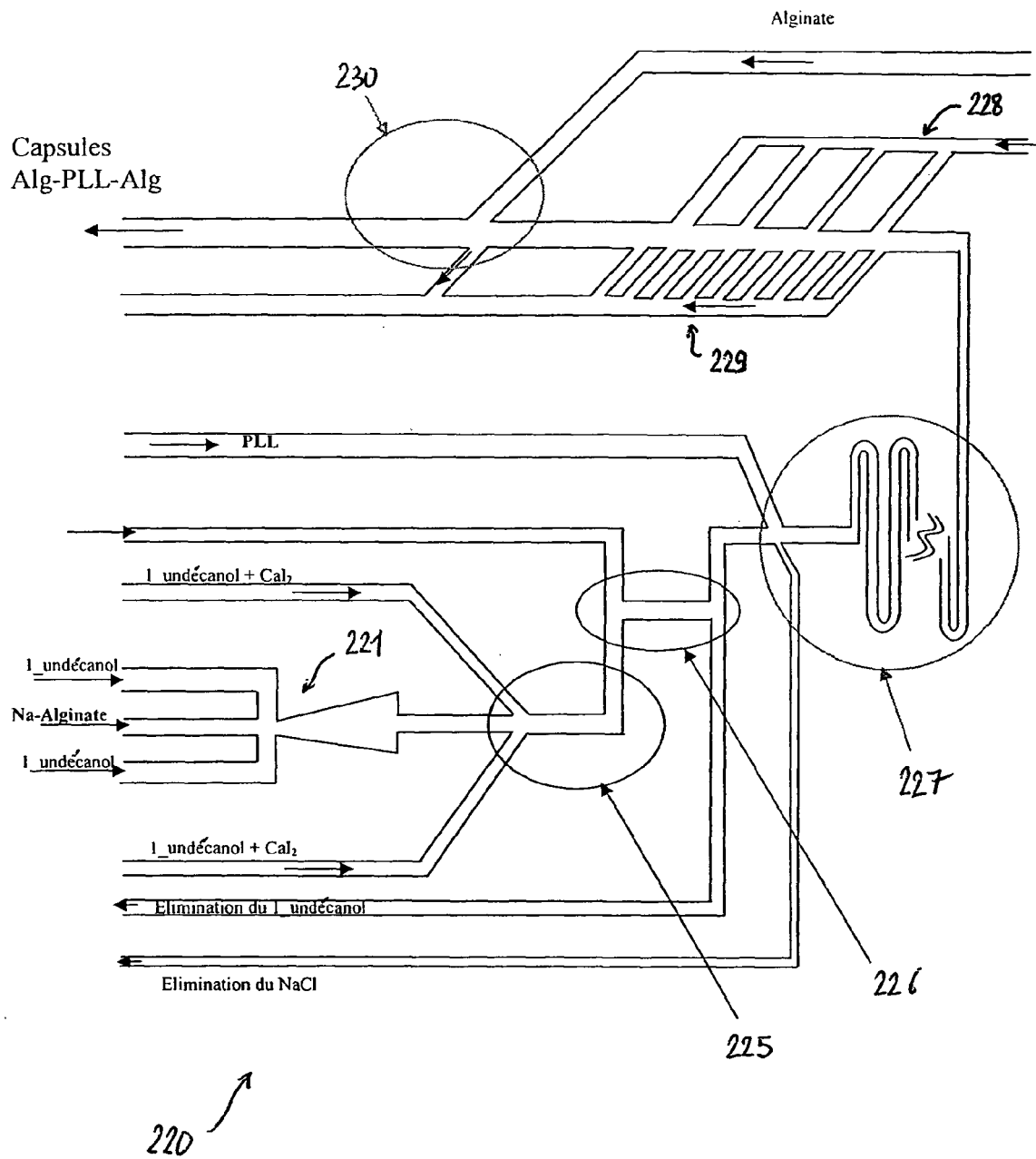


Fig. 21

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 2004037374 A [0008]
- US 20070059781 A [0008]
- US 20070026381 A [0008]
- JP 2007021465 A [0008]
- JP 2006263693 A [0008]
- JP 2004154747 A [0008]
- WO 2006102258 A [0008]
- US 20050133480 A [0008]
- WO 2006079007 A [0008]
- WO 2002023163 A [0008]
- WO 0240874 A [0008]
- WO 2004071638 A [0012]
- US 20070054119 A [0012]
- FR 2776535 A [0012]
- JP 2003071261 A [0012]
- US 20060121122 A [0012]
- US 20060051329 A [0012] [0013]
- WO 2005103106 A [0012] [0013]
- WO 2006078841 A [0012]
- US 20070009668 A [0014]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **De Vos.** Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation*, 1996, vol. 62, 893-899 [0094]
- **Lehmann, R.** Superiority of small islets in human islet transplantation. *Diabetes*, 2007, vol. 56, 594-603 [0094]
- **Zimmermann.** Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM-, and AFM-imaging. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, 2083-2096 [0094]
- **Goosen.** Electrostatic droplet generation for encapsulation of somatic tissue: assessment of high-voltage power supply. *Biotechnol.Prog.*, 1997, vol. 13, 497-502 [0094]
- **Seifert.** Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol.Prog.*, 1997, vol. 13, 562-568 [0094]
- **Huang.** Continuous particules separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 2004, vol. 304, 987-990 [0094]
- **Davis.** Deterministic hydrodynamics: taking blood apart. *PNAS*, 2006, vol. 103 (40), 14779-14784 [0094]
- **Inglis.** Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement. *Lab on a chip*, 2006, vol. 6, 655-658 [0094]
- **Yamada.** Microfluidic particle sorter employing flow splitting and recombining. *Anal.Chem*, 2006, vol. 78, 1357-1362 [0094]
- **Yamada.** Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab on a chip*, 2005, vol. 5, 1233-1239 [0094]
- **Yamada.** Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Anal.Chem*, 2004, vol. 76, 5465-5471 [0094]
- **Takagi.** Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches. *Lab on a chip*, 2005, vol. 5, 778-784 [0094]
- **Thorsen.** Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, 2001, vol. 86 (18), 4163-4166 [0094]
- **Anna.** Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied physics letters*, 2003, vol. 82 (3), 364-366 [0094]
- **Suguiura.** Interfacial tension driven monodispersed droplet formation from microfabricated channel array. *Langmuir*, 2001, vol. 17, 5562-5566 [0094]
- **Suguiura.** Size control of calcium alginate beads containing living cells using micronozzle array. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, 3327-3331 [0094]
- **Wyman.** Immunoisolating pancreatic islets by encapsulation with selective withdrawal. *Small*, 2007, vol. 3 (4), 683-690 [0094]